

Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe –
Innenstadt Klinikum der Universität München
Direktor: Prof. Dr. K. Frieze

**Die typenspezifische humorale Immunantwort gegen
verschiedene HPV-Kapside (HPV-L1 6, 11, 16, 18, 31, 33,
35, 45) im Zusammenhang mit dem Nachweis von
typenspezifischer HPV-DNA bei Frauen mit
rezidivierenden Zervixdysplasien**

Dissertation
zum
Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät
der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Marc Philipp Christian Mosner
aus München

2004

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter:

Prof. Dr. G. Stauber

Mitberichterstatter:

Prof. Dr. J. Diebold

Prof. Dr. D. J. Schendel

Betreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dr. med. Dipl. Chem. T. Grubert

Dekan:

Prof. Dr. med. Dr. h.c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung:

28. Oktober 2004

Meinen lieben Eltern

| | | |
|------------|---|-----------|
| 1. | Einleitung | 1 |
| 1.1. | Charakterisierung und Einteilung der humanen Papillomaviren | 1 |
| 1.2. | Übertragung von humanen Papillomaviren | 3 |
| 1.3. | Risikofaktoren für HPV-Infektionen und die Entwicklung von Zervixkarzinomen | 3 |
| 1.4. | Molekulargenetischer Aufbau des humanen Papillomavirus | 6 |
| 1.5. | Pathogenese der HPV-Infektion | 8 |
| 1.6. | HPV-Onkogenese | 9 |
| 1.7. | Nachweis einer HPV-Infektion | 12 |
| 1.8. | Humorale Immunantwort auf HPV-Infektionen | 13 |
| 1.9. | Zielsetzung der Arbeit | 15 |
| 2. | Patientinnen, Material und Methoden | 16 |
| 2.1. | Patientinnen | 16 |
| 2.1.1. | Studienpopulation | 16 |
| 2.1.2. | Probengewinnung für HPV-DNA-Analysen und HPV-Antikörperbestimmungen sowie für histologische und zytologische Untersuchungen | 18 |
| 2.2. | Material und Methoden | 19 |
| 2.2.1. | Herstellung typenspezifischer Viruskapside in BSC-1 Affennierenzellkulturen | 19 |
| 2.2.1.1. | Prinzip der Kapsidherstellung | 19 |
| 2.2.1.2. | Anzucht der BSC-1 Affennierenzellen | 19 |
| 2.2.1.3. | Infizierung der BSC-1 Zellen mit HPV L1 Impfviren | 19 |
| 2.2.1.4. | Isolieren der Kapside | 20 |
| 2.2.1.5. | Reinigen der Kapside | 20 |
| 2.2.2. | Kontrolle der Kapside mit Western-Blot-Analyse | 21 |
| 2.2.2.1. | Prinzip des Western-Blots | 21 |
| 2.2.2.2. | Durchführung des Western-Blots | 22 |
| 2.2.3. | Das Kapsid-ELISA-Verfahren zur Testung der Patientinnen auf HPV-Antikörper | 23 |
| 2.2.3.1. | Prinzip des Kapsid-ELISAs | 23 |
| 2.2.3.2. | Durchführung des Kapsid-ELISAs | 24 |
| 2.2.3.3. | Auswertung der ELISA-Ergebnisse | 25 |
| 2.2.4. | HPV Consensus Primer PCR/ Reverse-Line-Blot-Verfahren zur Analyse auf HPV-DNA in Zervixabstrichen | 26 |
| 2.2.4.1. | Prinzip der HPV-DNA-Analyse | 26 |
| 2.2.4.2. | Extraktion der DNA | 26 |
| 2.2.4.3. | HPV-L1 Consensus Primer PCR zur Amplifikation der HPV-DNA | 27 |
| 2.2.4.3.1. | Prinzip der Amplifikation | 27 |
| 2.2.4.3.2. | Durchführung der Amplifikation | 29 |
| 2.2.4.4. | HPV-DNA-Typisierung mit Reverse-Line-Blot-Verfahren | 30 |
| 2.2.4.4.1. | Prinzip der Reverse-Line-Blot-Typisierung | 30 |
| 2.2.4.4.2. | Durchführung der Reverse-Line-Blot-Typisierung | 30 |
| 2.2.5. | Statistische Auswertung | 32 |

| | | |
|-----------|---|----|
| 3. | Ergebnisse | 33 |
| 3.1. | Prävalenz von HPV-Kapsid-Antikörpern und HPV-DNA | 33 |
| 3.1.1. | Prävalenz von HPV-Kapsid-Antikörpern im Serum | 33 |
| 3.1.2. | Prävalenz von HPV-DNA im Zervixabstrich | 37 |
| 3.2. | Vergleich der ELISA-Ergebnisse mit der parallel im Zervixabstrich gefundenen HPV-DNA | 39 |
| 3.3. | Einfluss des Infektionsablaufes und der Dauer des DNA-Nachweises auf die Antikörperbildung | 43 |
| 3.4. | Einfluss chirurgischer Interventionen am Cervix uteri auf die Antikörperentwicklung und den DNA-Status | 51 |
| 3.4.1. | Allgemeine Veränderungen der Antikörperreaktionen prae- und postoperativ | 51 |
| 3.4.2. | Einfluss chirurgischer Interventionen an der Cervix uteri auf die Antikörperentwicklung in Abhängigkeit vom praeoperativen HPV-DNA-Status | 54 |
| 3.4.3. | Vergleich der DNA-Nachweise prae- und postoperativ | 56 |
| 3.5. | HPV-DNA- und Antikörpernachweise im Vergleich zum histologischen Status | 58 |
| 3.5.1.1. | Einmalige HPV-Antikörpernachweise im Vergleich zur Histologie | 58 |
| 3.5.1.2. | Verlauf der HPV-Antikörpernachweise im Vergleich zur Histologie | 61 |
| 3.5.2.1. | Einmalige HPV-DNA-Nachweise im Vergleich zur Histologie | 64 |
| 3.5.2.2. | Verlauf der HPV-DNA-Nachweise im Vergleich zur Histologie | 66 |
| 3.5.3. | Kombination der DNA- und Antikörpernachweise im Vergleich zur Histologie | 68 |
| 3.6. | Prüfung von anamnestischen Parametern auf Risiko- beziehungsweise Ko-faktoren für die Entwicklung schwere intraepithelialer Neoplasien | 70 |
| 4. | Diskussion | 72 |
| 4.1. | Prävalenz von HPV-DNA und HPV-Antikörpern | 72 |
| 4.1.1. | HPV-DNA-Prävalenz | 72 |
| 4.1.2. | HPV-Antikörper-Prävalenz | 74 |
| 4.2. | Vergleich des HPV-DNA-Spektrums im Zervixabstrich mit der parallel gefundenen Seroreaktivität | 76 |
| 4.3. | Einfluss des Infektionsablaufes und der Dauer des DNA-Nachweises auf die Antikörperbildung | 79 |
| 4.4. | Einfluss chirurgischer Interventionen am Cervix uteri auf die Antikörperentwicklung und den DNA-Status von HP-Viren | 84 |
| 4.5. | Serum-Antikörpernachweise gegen HPV-VLPs im Zusammenhang mit der histologischen Entwicklung | 87 |
| 4.6. | HPV-DNA-Nachweise aus Zervixabstrichen im Zusammenhang mit der histologischen Entwicklung | 92 |
| 4.7. | Testkombination aus HPV-DNA-Nachweisen am Zervix und Antikörpernachweisen im Serum im Zusammenhang mit der histologischen Entwicklung | 95 |
| 4.8. | Prüfung von anamnestischen Parametern auf mögliche Risikofaktoren für eine schwere intraepitheliale Neoplasie | 97 |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-----------|------------------------------------|------------|
| 5. | Zusammenfassung | 98 |
| 6. | Literaturverzeichnis | 100 |
| 7. | Abkürzungsverzeichnis | 113 |
| 8. | Danksagung | 115 |
| 9. | Lebenslauf | 116 |

1. Einleitung

Humane Papillomaviren (HPV) sind weit verbreitet. Sie infizieren sehr gewebespezifisch bestimmte proliferierende Epithelzellen und werden für eine Reihe von Haut- und Schleimhautveränderungen, wie Warzen, Larynxpapillome, Condylomata acuminata, sowie anogenitale Dysplasien und Karzinome verantwortlich gemacht (zur Hausen, 1991; Syrjänen et al., 1987; Pfister, 1984). Neuere Studien sehen sogar einen Zusammenhang mit dem Spinaliom und der Psoriasis (Majewski et al., 2001; Harwood et al., 2000). Allerdings scheint eine Infektion mit HPV allein nicht ausreichend, erst die Einwirkung weiterer Kofaktoren führt zur Manifestation klinischer Krankheitsbilder (Kataja V et al., 1993; Hippeläinen et al., 1993; Bauer HM et al., 1993).

Das Zervixkarzinom ist weltweit die zweithäufigste Krebserkrankung der Frau nach dem Mammakarzinom. Obwohl die Inzidenz in den westlichen Industrienationen, dank erfolgreicher Screeningprogramme stark rückläufig ist, erkranken global immer noch jährlich ca. 440000 Frauen, vor allem in den Ländern der dritten Welt (statistisches Bundesamt). Angesichts dieser Zahlen kommt der Erforschung des Zervixkarzinoms und dem damit eng verbundenen humanen Papillomavirus eine große Bedeutung zu.

1.1. Charakterisierung und Einteilung der humanen Papillomaviren

Humane Papillomaviren (HPV) gehören zu der Gruppe der Papovaviridae. Sie besitzen ein ungefähr 7900 Basenpaare großes, zirkuläres Genom aus doppelsträngiger DNA, das im Virion mit zellulären Histonen (low molecular weight protein) komplexiert ist. Das die DNA umgebende Kapsid setzt sich aus 72 pentamerisch geformten Kapsomeren zusammen. Es hat einen Durchmesser von 55nm und gibt dem Virus eine kugelige Gestalt in Form eines Ikosaeders. Eine Lipoproteinhülle fehlt (Galloway et al., 1989; Howley 1990) (siehe Abbildung 1.1.).

Man unterscheidet inzwischen etwa hundert verschiedene HPV-Typen, davon spielen etwa vierzig eine Rolle bei anogenitalen Infektionen. Die gleichen Typen können Läsionen in der Mundschleimhaut, der Konjunktiva und dem Larynx verursachen und werden daher als mykosotrope HPV-Typen bezeichnet (de Villiers, 1997).

Im Gegensatz zu anderen Viren, die aufgrund ihrer Antigenstruktur in „Serotypen“ eingeteilt werden, typisiert man die Papillomaviren nach ihrer DNA-Homologie in „Genotypen“. HP-

Viren werden dann als unterschiedliche Typen bezeichnet, wenn die Nukleotidsequenz der offenen Leserahmen (open reading frames = ORF) E6, L1 und der nicht kodierenden Region (noncoding region = NCR) des Genoms (siehe 1.4.), weniger als 90% Übereinstimmung zeigen. Von Subtypen spricht man, wenn sie sich nur in 2% –10% der kodierenden Regionen differieren. Varianten liegen bei einer Homologie von mehr als 98% vor (Chang et al., 1992; van Ranst et al., 1992).

Entsprechend ihres onkogenen Transformationsrisikos unterscheidet man bei genitalen HPV-Typen zwei Klassen. Viren, die gutartige Läsionen mit geringem Karzinomrisiko hervorrufen, wie zum Beispiel HPV 6 und 11, werden als „low risk“ HPV Typen bezeichnet. Viren mit einem hohen onkogenen Risiko wie HPV 16 und 18, sowie die seltener auftretenden Typen 31, 33, 35 und 45, werden als „high risk“ HPV Typen bezeichnet (zur Hausen, 1994; Gissmann, 1992). In nahezu 100% aller invasiven genitalen Neoplasien ist HPV-DNA nachweisbar, wobei der Anteil an HPV 16 etwa 60% und der an HPV 18 etwa 20% beträgt (van den Brule et al., 1991; Walboomers et al., 1999).

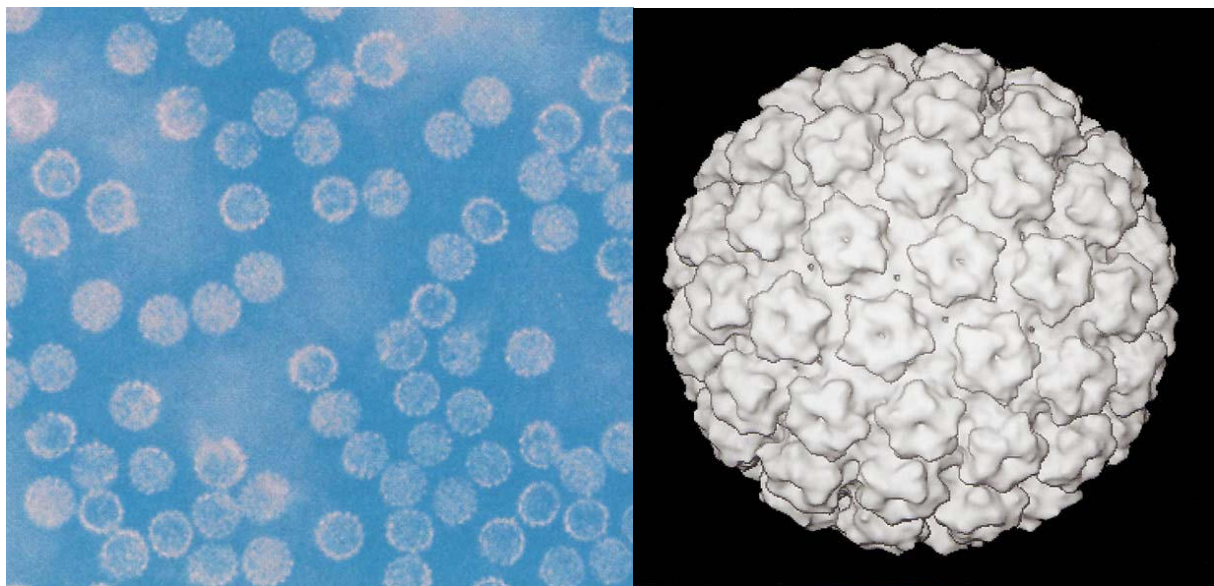


Abbildung 1.1.: Links: Elektronenmikroskopische Aufnahme von VLPs (virus-like particles), die äußerlich nicht von humanen Papillomaviren (HPV) zu unterscheiden sind. Rechts: Drei-dimensionale Rekonstruktion eines HPV-Kapsids, das aus 72 Kapsomeren zusammengesetzt ist, wobei jedes Kapsomer aus fünf L1-Molekülen besteht. (Abbildung modifiziert nach Hagensee et al., 1993 und Galloway, 1994).

1.2. Übertragung von humanen Papillomaviren

Die HPV-Typen, die eine klinische Infektion der anogenitalen Region verursachen, werden in den meisten Fällen sexuell übertragen (Kjaer et al., 2001). Jedoch sind immer noch einige Aspekte der HPV-Transmission unklar. Es wurde zum Beispiel berichtet, dass einige Frauen das Virus bereits nach wenigen sexuellen Kontakten übertragen, andere jedoch niemals ihren Partner infizieren, trotz häufiger Kontakte (Maymon et al., 1995). Zusätzlich zu der Anzahl der übertragenen Viren wird die Transmission von weiteren Faktoren wie Expositionsdauer, Expositionshäufigkeit und Faktoren des Wirts selbst beeinflusst (Stone, 1995). Im allgemeinen scheint aber die Übertragung während des Geschlechtsverkehrs relativ häufig zu sein (Kjaer et al., 2001).

HPV kann außerdem von dem infizierten Genitaltrakt der Mutter auf das Neugeborene übertragen werden. Jedoch entwickelt sich eine respiratorische Papillomatose nur sehr selten (Shah et al., 1992).

Weiterhin werden die digitale und orale Übertragung sowie die Autoinokulation beschrieben (Mindel et al. 1999).

1.3. Risikofaktoren für HPV-Infektionen und die Entwicklung von Zervixkarzinomen

Zahlreiche epidemiologische Studien in den letzten 20 Jahren, konnten verschiedene Risikofaktoren für die Entwicklung des Zervixkarzinoms identifizieren. Mit der Zeit stellte sich die Akquirierung einer HPV-Infektion als der Hauptrisikofaktor überhaupt dar (zur Hausen and Richart, 1995). Allerdings gilt es heute als bewiesen, dass die HPV-Infektion eine notwendige, aber keine ausreichende Bedingung für die Entwicklung eines Zervixkarzinoms ist (zur Hausen et al., 1994; Walboomers et al., 1999). Also spielen weitere Kofaktoren bei der malignen Transformation eine Rolle (Kataja et al., 1993; Hippeläinen et al., 1993; Bauer et al., 1993). Gestützt wird diese These durch die lange Latenzzeit zwischen der viralen Primärinfektion und dem Auftreten eines invasiven Tumors, die über Jahrzehnte vorausgehen kann. Außerdem ist Tatsache, dass nur ein Bruchteil der klinisch manifesten HPV-assoziierten Läsionen in ein Karzinom übergehen (Friis et al., 1997). Kofaktoren könnten auch Antwort auf die Frage geben, warum eine HPV-Infektion bei dem einen Patienten erfolgreich bekämpft wird, beim anderen persistiert und beim dritten schließlich in ein Karzinom mündet.

Diese Erkenntnis hat die Rationale der epidemiologischen Forschung im Bereich Zervixkarzinom grundlegend geändert. Alle bisher untersuchten Risikofaktoren müssen nun dahingehend untersucht werden, ob sie nur die Akquirierung einer HPV-Infektion begünstigen, Kofaktoren sind, welche die maligne Transformation infizierter Keratinozyten fördern oder wirklich unabhängige Faktoren sind.

Da HPV hauptsächlich durch Geschlechtsverkehr übertragen wird, stellt das **Sexualverhalten** den wichtigsten Risikofaktor für das Erlangen einer HPV-Infektion dar (Kataja et al., 1993; Hippeläinen et al., 1993). Erste sexuelle Erfahrungen vor dem 16. Lebensjahr, Promiskuität, Häufigkeit des vaginalen Verkehrs und beim Geschlechtspartner die Anzahl der bisherigen Sexualpartner sind die Hauptrisikofaktoren (Bauer et al., 1993; Burk et al. 1996). In einer Studie wurde als der stärkste Risikofaktor, die Anzahl der Sexualpartner in den vorhergehenden zwei Jahren identifiziert (Kataja et al., 1993). Eine kürzere Schulausbildung, geringeres Einkommen sowie andere sexuell übertragene Krankheiten können ebenfalls als Risikofaktoren betrachtet werden (Ho et al., 1998; Schiff et al., 2000).

Gestörte zelluläre Immunität scheint bei der Progression einer HPV-Infektion einen entscheidenden Beitrag zu leisten. So steigt die Prävalenz von HPV-assoziierten Läsionen bei HIV-Infizierten mit fortschreitender Immunsuppression. Gleichzeitig sprechen die Patienten schlechter auf eine Therapie an. Jedoch scheint dabei auch eine Interaktion von HI- und HPV-Viren, mit lokaler Immunsuppression, eine Rolle zu spielen (Clarke et al., 2002; Mistro et al., 2001). Ähnliche Progredienz beobachtet man im Verlauf einer **Schwangerschaft**. Da man gleichzeitig eine hohe Regressionsrate nach der Geburt beobachtet, könnte auch hier eine Unterdrückung der maternalen zellgebundenen Immunität eine Rolle spielen (Senthil et al., 1998). Uneinig ist man sich bei den **oralen Kontrazeptiva**, die eine Assoziation mit der Entstehung des Zervixkarzinoms zeigen (Schiffman und Brinton, 1995). So ist es nicht eindeutig, ob durch die Pilleneinnahme die Aktivität von HPV oder lediglich die Anzahl der Partner ohne geschützten Geschlechtsverkehr und damit die Exposition gegenüber HPV erhöht wird. Für die erste Annahme spricht, dass hormonabhängige Elemente in der Regulatorregion (noncoding region = NCR) von bestimmten HPV-Typen gefunden wurden, die *in vitro* die HPV-Transkription in Anwesenheit von Steroidhormonen erhöhen (Gloss et al., 1987; Pater et al., 1988).

Kjellberg et al. (2000) konnten in ihrer Studie zeigen, dass **Rauchen** signifikant dosisabhängig mit der Entwicklung von Cervicalen Intraepithelialen Neoplasien Grad II und III (CIN II/III Läsionen) korreliert und eine gleichzeitige Assoziation mit einer HPV-Infektion nicht notwendig ist. Sie betrachteten folglich Rauchen als einen wirklich unabhängigen Risikofaktor. Es konnte auch gezeigt werden, daß eine **genetische Prädisposition** für das Zervixkarzinom besteht: aus dem schwedischen nationalen Krebsregister (1958 - 1993) wurden 71533 Frauen (85% Karzinome in situ, 10% Dysplasien, 5% invasive Karzinome) mit ihren 126893 Verwandten sowie 194810 Kontrollfällen und deren 334961 Verwandten verglichen. Das familiäre relative Risiko für das Erkranken an einer zervikalen Neoplasie lag für biologische Töchter bei 1,83 (1,77-1,88), für biologische Schwestern bei 1,93 (1,85-2,01) und für nicht-biologische Schwestern bei 1,15 (0,82-1,52) (Magnusson et al., 1999).

1.4. Molekulargenetischer Aufbau des humanen Papillomavirus

Die DNA-Sequenz des HP-Virus enthält nur auf einem seiner beiden Stränge hoch konservierte offene Leserahmen, sogenannte „open reading frames“ (ORF), die in drei Gruppen eingeteilt werden (Chen et al., 1982). Die frühe E-Region („early region“), bestehend aus 6-8 offenen Leserahmen (E1-E8), wird vor allem in den unteren Zellschichten expremiert und ist unter anderem für die Replikation und die Transformation verantwortlich. Die späte L-Region („late region“) enthält die Leserahmen L1 und L2, die für die Strukturproteine des Kapsids kodieren und in den äußeren Zellschichten expremiert werden. Zwischen dem 3'-Ende der L-Region und dem 5'-Ende der E-Region befindet sich eine nicht kodierende Region (NCR = noncoding region) oder auch „upstream regulatory region“ (URR) genannt. Sie enthält regulierenden Elemente, die für die Replikation der viralen DNA notwendig sind (Galloway et al., 1989; Chow et al. 1991) (siehe Abbildung 1.2).

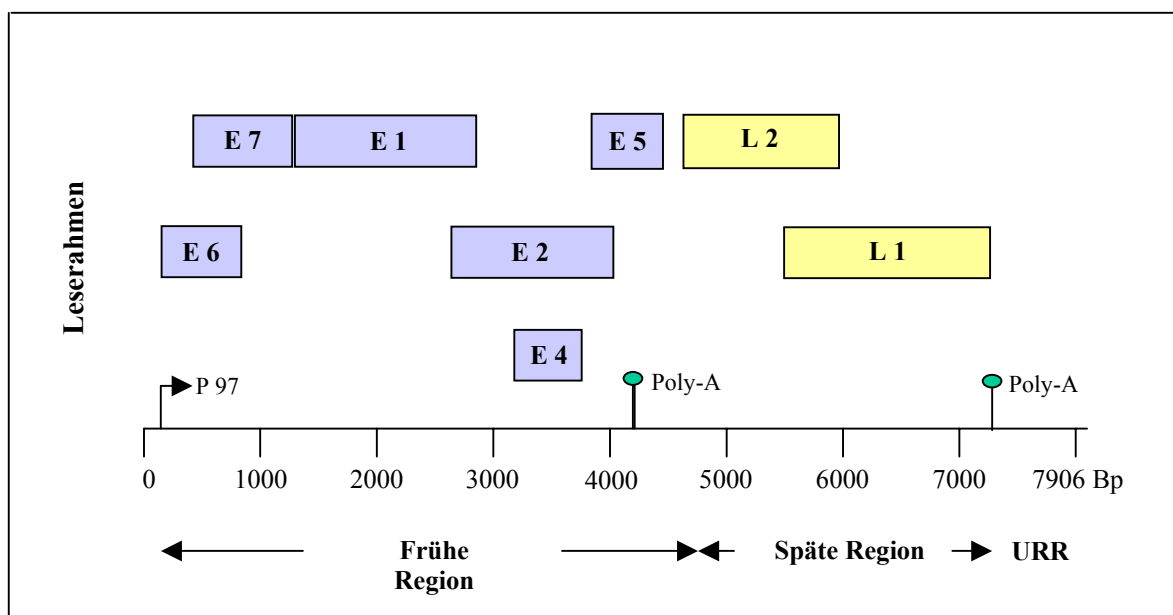


Abbildung 1.2.: Schematischer Aufbau des humanen Papillomavirusgenoms am Beispiel von HPV 16. Das normalerweise zirkuläre Genom ist hier linear dargestellt. Die offenen Leserahmen E1 bis E7 kodieren für die frühen Proteine, die an der viralen Replikation und der Transformation beteiligt sind. Die Gene L1 und L2 kodieren für die Kapsidproteine. Ein in der URR lokalisierten Promotor (P 97) und die Polyadenylierungsstellen sind angegeben (Abbildung modifiziert nach Galloway, 1998)

Dem **E1** Protein kommt eine wichtige Rolle bei der viralen DNA-Replikation zu (Ustav und Stenlund, 1991). Durch die Bindung an das E2-Genprodukt könnte dieses zum Replikations-

ursprung dirigiert werden (Mohr et al. 1990).

Das **E2**-Gen kodiert für drei spezifische DNA-bindende Proteine, die in der Transkriptionsregulation des viralen Genoms involviert sind. Eines davon wirkt als Transkriptionsaktivator, während die anderen beiden als Transkriptionsrepressoren wirken. Werden in Zellen, die mit HPV-DNA transformiert wurden, die E1 und E2 Leserahmen zerstört, so kommt es zu einer Integration der Virus-DNA in das Wirtszellgenom. (Howley, 1990; Lambert et al., 1991; Chiang et al., 1992)

Die genaue Funktion von **E4** ist noch nicht bekannt. Im Gegensatz zu allen anderen Papillomavirusproteinen ist es ein zytoplasmatisches Protein, das erst spät in der viralen Entwicklung, zusammen mit den Kapsidproteinen gebildet wird (Crum et al., 1990). Dies legt den Schluß nahe, daß es bei der Virusreifung eine Rolle spielen könnte, obwohl es in der frühen Region des HPV-Genoms liegt. (Chow et al., 1987; Nasser et al., 1987; Doorbar et al., 1991)

Für das Genprodukt von HPV-16 **E5** konnte gezeigt werden, dass es bestimmte etablierte Mauszelllinien epidermalen Ursprungs (p117 und PAM 212) transformieren kann (Leptak et al., 1991). Ob allerdings HPV-16 E5 bei humanen Keratinozyten ebenfalls einen Transformationsbeitrag leistet ist zur Zeit noch unklar.

E6 und **E7** werden in unterschiedlich starken Konzentrationen in Tumoren und Zervixkarzinomen gefunden und sind an der Tumorentstehung entscheidend beteiligt (Galloway and McDougall, 1996). In vitro ist sogar ihre Genexpression allein ausreichend, um Zellen zu immortalisieren. Allerdings müssen sie kontinuierlich transkribiert werden, um den Proliferationsstatus einer Zelle aufrecht zu erhalten (von Knebel Doeberitz et al., 1992). E2 unterdrückt die Transkription von E6. Eine Eliminierung oder Inhibierung von E2 scheint bei der Entwicklung zum Karzinom somit von Bedeutung zu sein. Das HPV-16-E6-Protein bindet an das Produkt des Tumorsuppressorgens p53, welches dann über den Ubiquitin-stoffwechsel schneller abgebaut wird (Mietz et al. 1992). E7 bindet unter anderem an das Retinoblastomgen und inaktiviert es dadurch (siehe unten) (Phleps et al., 1992).

L1 und **L2** kodiert für zwei unterschiedliche Strukturproteine aus denen das Viruskapsid aufgebaut ist. Die Proteine werden im Zellkern von terminal differenzierten Keratinozyten gebildet und dort an unterschiedlichen Stellen gesammelt, bevor sie zu Kapsiden assoziieren (Shin-Je Ghim et al. 1993). Mindestens 80% des Kapsids bestehen aus den Hauptkapsidproteinen (L1), wobei L1 außen und L2 innen lokalisiert ist. Tests haben gezeigt, dass auch die Expression von L1 alleine ausreichend ist, um ein Viruskapsid herzustellen. L2 scheint dabei nur den Vorgang zu beschleunigen (Hagensee et al., 1994).

1.5. Pathogenese der HPV-Infektion

Initiales Ereignis bei der Infektion mit HPV ist ein Mikrotrauma der Epithelzellen, zum Beispiel durch Abrasionen beim Geschlechtsverkehr, und der Eintritt von HPV in eine oder mehrere teilungsfähige Basalzellen (Shah et al., 1992). Besonders leichten Zugang zu den Basalzellen haben die HP-Viren an der Cervix uteri, wo das hochprismatische Zylinderepithel der Endozervix zum mehrschichtigen Plattenepithel der Exozervix wechselt, der sogenannten Transformationszone. Neun von zehn zervikalen Dysplasien zeigen ihren Ursprung an dieser Stelle.

Nach einer Latenzphase werden zunächst die viralen Genome extrachromosomal, in den Kernen repliziert und ungefähr 50 bis 100 Kopien pro Zelle angefertigt. Wenn sich die infizierten Zellen teilen, wird die Virus-DNA auf beide Zellen aufgeteilt. Während sich die eine Tochterzelle weiter ausdifferenziert, teilt sich die andere weiter und stellt ein Reservoir viraler DNA für weitere Zellteilungen dar. Da die Produktion von HP-Viren auf die suprabasalen Zellen beschränkt ist, werden die Basalzellen nicht lysiert und die Infektion kann so über mehrere Jahre persistieren (Stubenrauch et al., 1999).

Der Lebenszyklus des humanen Papillomavirus ist eng mit der epithelialen Zelldifferenzierung verknüpft. Während sich die Basalzellen vermehren, wandern die Epithelzellen kontinuierlich zur Hautoberfläche, wo sie sich abflachen, austrocknen und abschuppen. Nur die frühen HPV-Gene werden in den tieferen Epithelschichten transkribiert, während die späten Gene in den oberen differenzierten Schichten exprimiert werden. Eine vollständige Ausbildung von Viruspartikeln ist folglich auf die äußeren Schichten der Haut und Schleimhaut beschränkt (Beutner et al., 1997). Dies ist auch der Grund, warum es noch nicht gelungen ist HP-Viren in ausreichenden Mengen in Zellkulturen zu produzieren.

In normalen Epithelzellen tritt eine Tochterzelle nach der Zellteilung aus dem Zellzyklus aus und beginnt sich zu differenzieren. Begleitet wird dies meist von einer Degeneration des Zellkerns. Da aber das HPV zur Replikation die Zellenzyme benötigt, durchlaufen infizierte Suprabasalzellen eine letzte Synthesephase und kopieren ihr Genom in großen Mengen, bevor sie es in neu produzierte Kapside verpacken. HP-Viren verhindern folglich den Austritt aus dem Zellzyklus. Bei high-risk HP-Viren wird dies, durch die Expression von E6 und E7 erreicht (siehe unten) (Halbert et al., 1992; Cheng et al., 1995; Ruesch et al., 1998).

1.6. HPV-Onkogenese

Die Annahme, dass Papillomavirusonkogene eine Rolle bei der Entwicklung von anogenitalen Karzinomen spielen, basiert auf der fast ausnahmslosen Detektion von HPV-DNA und deren Proteinen E6 und E7 in Zervixkarzinomen (zur Hausen, 1991, Walboomers et al., 1999). Dennoch sind humane Keratinozyten, in vitro, nach Immortalisation durch high risk HPV-Typen nicht vollständig transformiert. Erst die wiederholte Passagierung immortalisierter Zellen führt zu Tumorgenität in immunsupprimierten Tieren (Nacktmäusen) (Hurlin et al., 1991). Eine maligne Konversion der immortalisierten Zellen kann auch durch Koinfektion eines aktivierten Onkogens wie ras (Crook et al., 1989) oder Einwirken eines anderen Karzinogens herbeigeführt werden (Garret et al., 1993). Galloway und McDougall erklärten 1996 diese Beobachtungen an Hand des folgenden zwei Punkte Modells (siehe Abbildung 1.3.):

1. E7 durchbricht das Signal, das normalerweise Suprabasalzellen daran hindert wieder in die Synthesephase (S-Phase) des Zellzyklus einzutreten. So ist der Kontrollpunkt, der eine Zelle daran hindert ohne vorangehender Mitose wieder in die S-Phase einzutreten, teilweise blockiert. Folglich entsteht ein Epithel, das in allen Schichten Proliferation und Mitosen zeigt. Jedoch ist eine Hyperplasie limitiert durch polyploide Zellen (Zellen mit mehreren Chromosomensätzen), die keine Mitose durchlaufen haben. Die gleichzeitig ablaufende Zelldifferenzierung bleibt von diesem Phänomen unbeeinträchtigt. Dennoch erhöht die größere Zahl proliferierender Zellen mögliche Angriffspunkte von zusätzlichen genetischen Veränderungen, die zu Neoplasien führen können.

2. Als Antwort auf eine DNA-Schädigung verbleiben Zellen normalerweise in der G1 oder G2-Phase. Wahrscheinlich zur Reparatur der DNA, bevor sie in die Synthesephase beziehungsweise Mitose eintreten (Hartwell, 1992). E6 und E7 gemeinsam können die G1 und G2 Kontrollpunkte umgehen, die DNA geschädigte Zellen abhalten mit dem Zellzyklus fortzufahren.

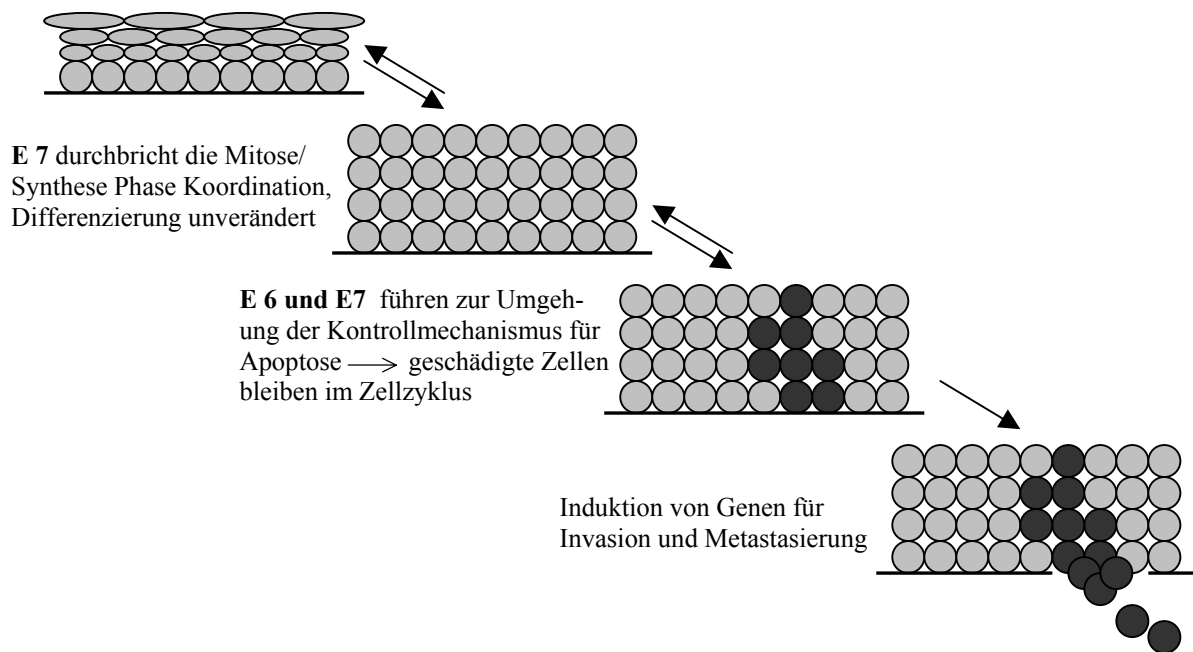


Abbildung 1.3.: Schematisches Modell für die Rolle von HPV E6 und E7 in der Progression zur Neoplasie. E7 induziert die Epithelzellproliferation, und beide, E6 und E7 zusammen, verhindern die Apoptose nach einer Chromosomenschädigung (Abbildung modifiziert nach Galloway and McDougall, 1996).

Die Funktionen von E6 und E7 sind genau beschrieben (siehe Abbildung 1.4.).

Indem **E6** an das Protein des Tumorsuppressorgens p53 bindet, beschleunigt es dessen Abbau durch die ubiquitin-abhängige Proteolyse. Das Protein von p53 stimuliert eine Reihe von Genen, von denen das p21 das entscheidende ist (Kuerbitz et al., 1992; Brugarolas et al., 1995). Das p21-Protein inaktiviert die cyclin-abhängige Kinase durch Bindung, die durch Phosphorylierung das Retinoblastom-Protein (Rb-Protein) aktiviert. Das Retinoblastom-Protein wiederum induziert den Eintritt in die Synthesephase des Zellzyklus (siehe Abbildung 1.4.).

Folglich kann die Virus-DNA auch in infizierten Zellen repliziert werden, welche die Basalzellschicht verlassen haben. Gleichzeitig nimmt E6 der Zelle die Möglichkeit nach einer DNA-Schädigung in der G1-Phase zu verharren. Das Verbleiben in der G2-Phase des Zellzyklus ist nicht von p53 oder p21 beeinflusst und noch nicht vollständig geklärt (Levedakou et al., 1995; Galloway et al., 1994). Obwohl der G2-Kontrollpunkt zunächst unbeeinträchtigt bleibt, schwächt er sich unter der Einwirkung von E6 über die Zeit ab und führt zur Aneuploidien (Zellen mit unterschiedlichen Chromosomensätzen). Auch die Möglichkeit der Zelle zur Apoptose, die ebenfalls über p53 reguliert wird, ist durch E6 eingeschränkt.

E7 hat die Möglichkeit den G1 Kontrollpunkt unabhängig von p53 zu umgehen. (Demers et al., 1994; Slebos et al., 1994; Hickman et al., 1994) Es bindet an das phosphorylierte Retinoblastom-Protein und trennt die Untereinheit E2F ab. E2F aktiviert die Transkription einer Reihe von Genen, eingeschlossen Cyclin E (Ohtani et al., 1995; Geng et al., 1996), das für den Eintritt in die S-Phase notwendig ist (Ohtsubo et al., 1995). Außerdem kann E7 durch Inaktivierung des cdk Inhibitors p21 den Kontrollpunkt umgehen.

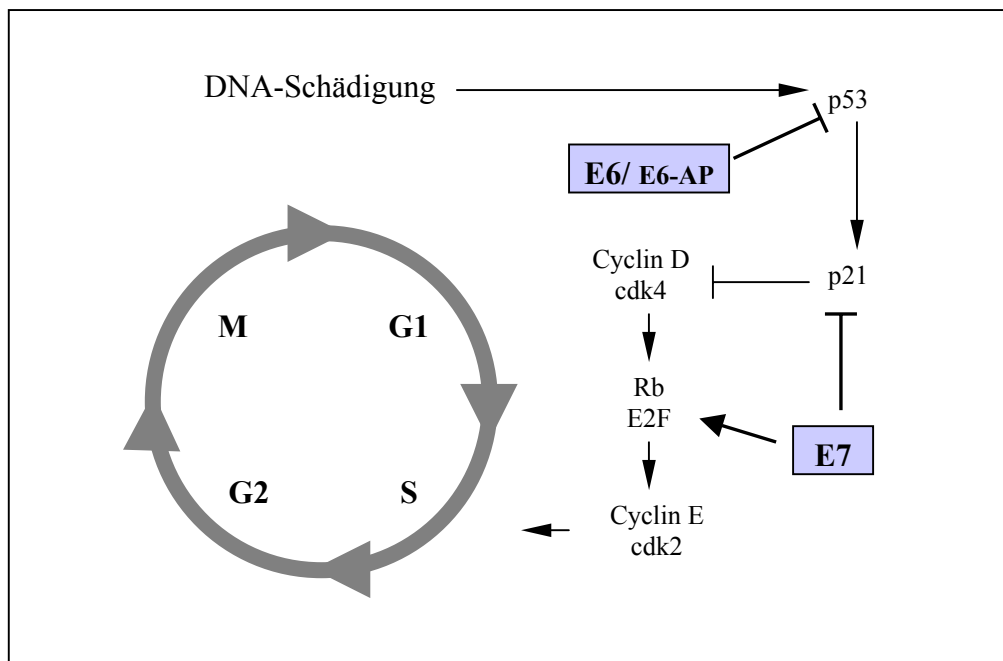


Abbildung 1.4.:Schematisches Modell, wie E6 und E7 die Kontrollmechanismen der DNA geschädigten Zellen inhibieren, um ein Austreten aus dem Zellzyklus zu verhindern. Erklärung siehe Text.

Diese Inaktivierung der G1 und G2 Kontrollpunkte bringt genetische Instabilität und die Unfähigkeit genetisch veränderte Zellen im Zellzyklus zu stoppen, was schließlich zur Entwicklung einer Neoplasie führt. Die Invasivität eines Karzinom, erfordert jedoch die Inaktivierung oder Aktivierung von weiteren Genen, die eine Penetration der Basalmembran begünstigen. Dazu sind zusätzliche genetische Veränderungen, bei gleichzeitig unveränderter HPV-Organisation notwendig. Auch eine Aktivierung von Wirtsonkogene durch die UR-Region kommt in Betracht. Erst im Stadium des invasiven Karzinoms wird die Virus-DNA in das Genom der Wirtszelle integriert. Bei den Vorläuferläsionen, den sogenannten intraepithelialen Neoplasien befindet sich die HPV-DNA noch episomal (Oriol et al., 1990).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Entwicklung eines invasiven Karzinoms nicht direkte Wirkung des HP-Virus ist. Es begünstigt lediglich durch die hervorgerufene genetische Instabilität weitere genetische Veränderungen.

1.7. Nachweis einer HPV-Infektion

Mit dem Wissen, dass bestimmte HPV-Infektionen untrennbar mit dem Zervixkarzinom verbunden sind, erhoffte man sich, durch den Nachweis von HPV bei Patienten mit auffälligen, aber nicht eindeutig pathologischen Zervixabstrichen (Pap III oder III D), eine weiterführende Risikoeinteilung vornehmen zu können. Denn bei Patientinnen mit high risk HPV-Infektionen würde man folglich eher erwarten, dass sich hinter der auffälligen Zytologie eine schwere Dysplasie bzw. ein Zervixkarzinom verbirgt, als bei Frauen ohne HPV-Infektionsnachweis. Dadurch würde eine große Anzahl sehr aufwendiger histologischer Untersuchungen umgangen, die zu einem Großteil unnötige Belastungen für die Patientinnen darstellen. Etwa 2,9% aller im Rahmen einer Vorsorgeuntersuchung entnommenen Abstriche, werden als zytologisch auffällig beurteilt, wovon aber nur 8-10% histologisch eine schwere Dysplasie oder ein Karzinom aufweisen (Davey et al., 1994; Kaufman et al., 1996).

In der Zytologie sind Anzeichen einer HPV-Infektion verstärkte zytoplasmatische Aufblähungen bzw. Hofbildungen um die Zellkerne, Koilozytose genannt, welche eine mehr oder weniger ausgeprägte Kernpolymorphie und –hyperchromasie zeigen können (Dekmezian et al., 1987; Roman et al., 1989). Allerdings ist auch eine ausgeprägte Koilozytose kein sicherer Beweis, dass eine virale Infektion mit HPV stattgefunden hat (Girardi et al., 1989). Folglich wurden eine Reihe an kommerziellen Test, wie Vira Pap-type®, HPV profile®, Hybrid Capture® and Hybrid Capture II®, (alle von der Digene Diagnostics, Silver Spring, Md, USA) entwickelt, die HPV-DNA, stellvertretend für eine HPV-Infektion, aus Abstrichmaterial nachweisen sollen.

Der experimentelle Einsatz dieser Techniken hat bislang ausgesprochen heterogene Einschätzungen der Prävalenz von genitalen HPV-Infektionen hervorgebracht (Koutsky et al., 1988). Hierfür wird teilweise eine Behinderung der exakten Probeentnahme durch die klinische Inapparenz zahlreicher Läsionen verantwortlich gemacht. Aber auch zeitliche Schwankungen bei der Virusproduktion könnten zu einer unterschiedlichen Einschätzung der HPV-Prävalenz in definierten Populationen geführt haben (de Villiers et al., 1987). Außerdem sind die verschiedenen Methoden zur Detektion von HPV-DNA aus Abstrichen und Gewebeproben nur begrenzt untereinander vergleichbar und zeigen in den Testergebnissen Schwankungen zwischen den einzelnen Labors. Dadurch wird eine genaue Analyse der bevölkerungsbezogenen Verbreitung verschiedener HPV-Typen erschwert (Munoz et al., 1988) und die Aussagekraft des viralen DNA-Nachweises eingeschränkt. Dies macht deutlich, dass man weitere

eventuell verlässlichere Marker für die Diagnose, Verlaufskontrolle und Überwachung von HPV-Infektionen benötigt. Aus diesem Grund erscheint es sinnvoll, ebenso wie es bei EBV (Ebstein-Barr-Virus) assoziierten Karzinomen ermöglicht wurde (Henle und Henle, 1976), auch bei Papillomaviren nach serologischen Nachweismethoden für assoziierte Erkrankungen zu suchen und daher die humorale Immunantwort besser zu erforschen.

1.8. Humorale Immunantwort auf HPV-Infektionen

Über die humorale Immunantwort auf HPV-Infektionen ist noch wenig bekannt. Obwohl die Serologie eines der vielversprechendsten Gebiete der virologischen Forschung ist, wurde dieser Weg bei der HPV-Forschung, im Vergleich zu den anderen Methoden, bis jetzt wenig beachtet. Ein Grund ist, dass es nicht gelingt Virionen (vollentwickelte Viren) in ausreichenden Mengen aus Laborkulturen oder HPV-Läsionen zu isolieren, um sie in immunologischen Tests einsetzen zu können. Ein weiterer Grund ist die Tatsache, dass große Teile der HPV-Gene erst in den äußeren Schichten des Epitheliums expremiert werden, daher keine virämische Phase durchlaufen und so wahrscheinlich nicht vollständig gegenüber dem Immunsystem exponiert werden.

Jahrelang wurden mit verschiedenen Testverfahren versucht, Antikörper gegen spezifische HPV-Typen nachzuweisen (Galloway et al., 1992). Allerdings waren die Ergebnisse schwierig zu interpretieren, weil die Forschungslabore verschiedene rekombinante und synthetische Proteine als Antigene verwendeten und unterschiedliche Populationen testeten. Außerdem waren die verwendeten Testverfahren von geringer Spezifität und Sensitivität. Inzwischen haben viele Labore die sehr sensitive Methode des L1-Kapsid-ELISAs angenommen (Hagensee et al., 1993), oder verwenden in vitro translatierte frühe Proteine, um Antikörper im Serum nachzuweisen. Dadurch lassen sich die verschiedenen Ergebnisse besser vergleichen und eine einheitliche Vorstellung über verschiedene Aspekte der humoralen Immunantwort entwickeln.

Da Antikörper bei Patienten mit persistierenden und rezidivierenden HPV-Läsionen detektiert werden können, ist es unwahrscheinlich, dass natürlich gebildete HPV-Antikörper einen signifikanten Einfluss auf den Verlauf der Infektion haben. Dennoch könnten Antikörper hilfreiche Marker sein, um subklinische HPV-Infektionen aufzudecken und zu überwachen. Deshalb ist es wichtig, den Ablauf der humoralen Immunantwort auf eine HPV-Infektion vollständig zu verstehen.

Studien am Tiermodel haben gezeigt, dass neutralisierende HPV-Antikörper vor einer Folgeinfektion mit dem gleichen HPV-Typen schützen können (Jarrett et al., 1990; Suizich et al., 1995). Eine erst kürzlich veröffentlichte Doppelblindstudie (Koutsky et al., 2002) mit 2392 Frauen, stellte außerdem eine signifikante Reduktion der Inzidenz von HPV-16-Infektionen und HPV-16 assoziierten Dysplasien nach Impfung mit HPV-16-Kapsiden fest. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine prophylaktische Impfung gegen das Zervixkarzinom möglich erscheint. Damit weiterhin Fortschritte bei der Entwicklung dieser Impfstoffe gemacht werden, müssen die Prävalenz und die Onkogenität vorkommender HPV-Typen einer Population genau bekannt sein. Für solche epidemiologischen Untersuchungen scheint sich die Serologie ebenfalls bestens zu bewähren und dem DNA-Nachweis überlegen zu sein (Strickler et al. 1999).

1.9. Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Patientinnen mit rezidivierenden Zervixdysplasien auf die Exposition möglichst vieler verschiedener genitaler humaner Papillomaviren zu testen. Gleichzeitig sollte die spezifische humorale Immunantwort auf diese HPV-Infektionen untersucht werden. Zusätzlich sollten die gemessenen Parameter auf den Nutzen als prädiktive Marker für die Entwicklung schwerer zervikaler Dysplasien getestet werden.

Zu diesem Zweck wurden retrospektiv Blutseren von Patientinnen der Dysplasiesprechstunde, der I. Universitäts-Frauenklinik in München, auf acht typenspezifische HPV-IgG-Antikörper (Typ 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 45) mittels L1-Kapsid-ELISA untersucht. Um besser Rückschlüsse auf die natürliche Entwicklung der Immunantworten schließen zu können und aktuelle HPV-Infektionen nachzuweisen, sollten zusätzlich die jeweils mit den Blutproben gleichzeitig entnommenen Abstriche auf das Vorkommen von HPV-DNA 27 verschiedener Typen mit Hilfe von PCR- und Lineblotverfahren bestimmt werden. Von den ausgewählten Frauen sollten mindestens drei Serumproben verschiedener Zeitpunkte mit parallelem Portioabstrich zur Verfügung stehen, um auch eine zeitliche Komponente berücksichtigen zu können. Diese retrospektiv untersuchten Patientinnen wurden zwischen drei und 71 Monaten betreut und dabei mit verschiedenen chirurgischen Methoden (Laserevaporation, Portioabrasio mit Zervixkürettage, Probiopsien, Konisationen) behandelt, wobei Histologien gewonnen wurden.

Im Einzelnen standen folgende Fragen im Vordergrund:

1. Gegenüber welchen HPV-Typen ist die untersuchte Population mit auffälligen Zervixzytologien exponiert?
2. In welchem Umfang werden spezifische Antikörper gegen genitale HPV-Kapside im Serum dieser Patienten gebildet?
3. Wie hängt das am Cervix uteri gefundene HPV-DNA-Spektrum mit den im Blut gebildeten Kapsidantikörpern zusammen?
4. Haben verschiedene chirurgische Behandlungsmethoden von Zervixdysplasien Einfluß auf den HPV-DNA-Nachweis und die Seroreaktivität gegenüber HPV-Kapsiden?
5. Sind die Nachweise von bestimmten HPV-Kapsid-Antikörpern beziehungsweise von typenspezifischen HPV-DNAs für die weitere histologische Entwicklung von Bedeutung und als prädikative Biomarker einsetzbar?
6. Welche zusätzlichen Risikofaktoren neben humanen Papillomavirus Infektionen spielen eine Rolle bei der Entwicklung schwerer Dysplasien?

2. Patientinnen, Material und Methoden

2.1. Patientinnen

2.1.1. Studienpopulation

Für die vorliegende Longitudinalstudie wurden 52 Patientinnen retrospektiv untersucht, die wegen rezidivierenden Zervixdysplasien die I. Universitätsfrauenklinik der LMU in den Jahren 1987 bis 1999 aufsuchten. Von jeder Frau sollten mindestens drei Zervixabstrich verschiedener Zeitpunkte mit parallel abgenommenen Blutseren für die labortechnischen Untersuchungen zur Verfügung stehen. Die Anzahl der Proben schwankte zwischen drei und sieben pro Patientin, wobei der Median drei betrug. Während des Beobachtungszeitraumes zwischen 3 und 71 Monaten (durchschnittlich 2,6 Jahre) wurden die Patientinnen mit verschiedenen chirurgischen Methoden (Laserevaporation, Portioabrasio mit Zervixkürettage, Probebiopsie, Konisation) behandelt und dabei Histologien gewonnen. Somit lagen 178 HPV-Abstriche, 178 Blutseren, 94 Histologien und 418 Pap-Abstriche zur Analyse vor.

Altersstruktur: Bei der Erstuntersuchung in der I. Universitätsfrauenklinik lag das mittlere Alter bei 31,4 Jahren, wobei die jüngste Patientin 21,4 und die Älteste 53,6 Jahre alt war. Die erste auffällige Zytologie bzw. Dysplasie dieser Frauen wurde im Durchschnitt mit 30,5 Jahren in der Regel vom niedergelassenen Gynäkologen diagnostiziert (siehe Abbildung 2.1.).

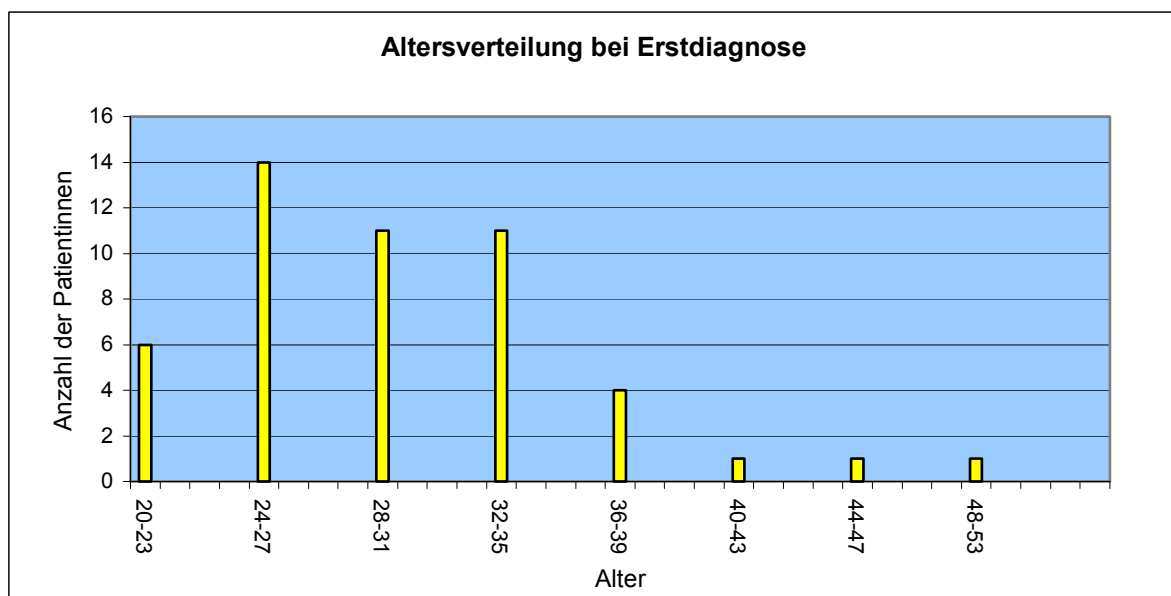


Abbildung 2.1.: Altersverteilung der Patientinnen bei Erstdiagnose einer auffälligen Zytologie bzw. Dysplasie.

Zytologisches Ergebnis bei erstmaliger Probenentnahme: Alle Patientinnen wurden von niedergelassenen Gynäkologen, nach wiederholt auffälligen Pap-abstrichen im Sinne der Münchner Nomenklatur, zur weiteren Behandlung in die Dysplasiesprechstunde der I. Universitätsfrauenklinik (I.UFK) überwiesen. Die Ergebnisse der Zytologie zum Zeitpunkt der ersten Probeentnahmen in der I. UFK sind in Tabelle 2.2. zusammengefasst.

| Münchner Nomenklatur | Zytologisches Bild | Anzahl der Patientinnen | Prozentzahl |
|---------------------------|---|-------------------------|-------------|
| I | unauffällig, keine Veränderungen | 0 | 0% |
| II | entzündliche, metaplastische Veränderungen | 10 | 20,8% |
| III | schwer entzündliche, degenerative Veränderungen | 7 | 14,6% |
| III D | leichte bis mäßige Dysplasie | 13 | 27,1% |
| IV a | schwere Dysplasie oder Ca in situ | 17 | 35,4% |
| IV b | schwere Dysplasie oder Ca in situ. Invasives Ca nicht ausgeschlossen. | 1 | 2,1% |
| fehlendes Ergebnis | | 4 | |

Tabelle 2.1.: Einteilung der Veränderungen am Zervix nach Papanicolaou, zum Zeitpunkt des Erstbesuches.

Rauchgewohnheiten: 23 (48,9%) der Frauen waren bei der Erstuntersuchung Raucherinnen. Neun dieser Patientinnen (19,1%) gaben an, weniger als zehn Zigaretten/Tag, und 14 (29,8%) mehr als zehn Zigaretten/Tag zu rauchen.

Hormonelle Einflußfaktoren: Nach Angaben der Patientinnen trat die Menarche durchschnittlich im Alter von 12,8 Jahren auf. Die Menopause hatte noch keine der Probandinnen erreicht. 62,5% der Frauen gaben an zwischen ein und sieben Schwangerschaften gehabt zu haben. Das Durchschnittsalter bei der ersten Schwangerschaft war 26,5 Jahre. Zum Zeitpunkt der Erstuntersuchung nahmen 50% der Frauen hormonelle Antikonzeptiva. 19% hatten einen Body-Mass-Index (Körpergewicht in kg/Körpergröße² in m; Normalwert bei Frauen zwischen 18 und 24) größer als 24 und somit starkes Übergewicht.

Sozialanamnese: 31% der Studiengruppe hatten eine akademische Ausbildung, 59% hatten eine abgeschlossene Berufsausbildung und 10 % keine Ausbildung. 38% lebten zum Zeitpunkt der Erstuntersuchung in einer festen Partnerschaft oder waren verheiratet, 62% waren geschieden oder ledig und ohne feste Bindung.

2.1.2. Probengewinnung für HPV-DNA-Analysen und HPV-Antikörperbestimmungen sowie für histologische und zytologische Untersuchungen

Zum Sammeln der Zervixabstriche für die HPV-DNA-Analyse wurde der Specimen Collection Kit der Firma Digene Diagnostics, Silver Spring, MD, USA verwendet. Dabei wurden Zellen der Transitionalzone mit einem Watteträger entnommen, in 1ml Transportmedium aufgenommen und bis zur Auswertung bei -21°C eingefroren.

Für die serologische HPV-Antikörperbestimmung wurden 5ml Blutproben nach den üblichen Standardverfahren venös abgenommen und bei -21°C gelagert.

Zur zytologischen Beurteilung des Gebärmutterhalses wurden die Portiooberfläche und der Zervikalkanal mittels Watteträger getrennt abgestrichen. Jeder der beiden Abstriche wurde auf einen separaten Objektträger übertragen und sogleich mit Alkohol fixiert. Anschließend wurden die Abstriche nach Papanicolaou gefärbt und entsprechend der Münchener Nomenklatur ausgewertet.

Histologien wurden je nach klinischer Einschätzung als Probebiopsie, Portioabrasio mit Zervixkürretage oder Konisation entnommen. Die Beurteilung erfolgte durch einen Pathologen der I. Frauenklinik der LMU.

2.2. Material und Methoden

2.2.1. Herstellung typenspezifischen Viruskapside in BSC-1 Affennierenzellkulturen

2.2.1.1. Prinzip der Kapsidherstellung

Für die spätere Verwendung im Kapsid-ELISA-Verfahren (siehe unten) wurde typenspezifische HPV-L1-Virushüllproteine (Kapside), wie beschrieben bei Hagensee 1993 (Hagensee et al., 1993) hergestellt. Zunächst wurden BSC-1 Zellen in Kulturschalen angezüchtet und dann mit Vaccinia-Virus Rekombinanten, die für das jeweilige L1-Hüllprotein kodieren, infiziert. Darauf produzierten die Zellen größere Mengen des gewünschten Kapsids. Um die Zellen von den sogenannten „virus-like particles“ (VLPs) abzutrennen, wurden sie gesammelt und mittels Ultraschall aufgespaltet. Danach wurden die Kapside durch eine Ultrazentrifugation an einem Cäsiumgradienten isoliert. Schließlich erfolgte eine Reinigung durch Dialysierung an PBS-D mit anschließender Ultrazentrifugation an einem Glykosegradienten. Insgesamt wurden nach diesem Schema acht verschiedene Typen von HP-Viruskapsiden hergestellt (HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 45).

2.2.1.2. Anzucht der BSC-1 Affennierenzellen

BSC-1 Affennierenzellen wurden in DMEM (Dulbecco's modification of Eagle's medium) mit 5% FBS (fetal bovine serum) und Antibiotika bei 37°C in Petrischalen mit einem Durchmesser von 150mm kultiviert. Eine Plastikschale enthielt durchschnittlich $1,4 \times 10^9$ Zellen. Die Zellen konnten nach Erreichen des Konfluenzstadiums einmal wöchentlich im Verhältnis 1/10 geteilt werden. Dazu wurde das Medium in den Kulturschalen abgesaugt und die Zellen mit jeweils 2 ml Trypsin 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Die adhären wachsenden Zellen wurden so vollständig gelöst und in neues Nährmedium überführt. Diese Zellsuspension wurde dann auf neue Schalen zehnfacher Menge aufgeteilt.

2.2.1.3. Infizierung der BSC-1 Zellen mit HPV L1 Impfviren

Die Zellen wurde mit rekombinanten Vaccinia-Viren, die nur für den jeweils typenspezifischen L1-Virusbestandteil kodieren, im Verhältnis 1:30 infiziert. Die entsprechende Virusmenge wurde nach der Titerangabe der Ausgangssuspension in DMEM gelöst und in der Menge von 2,5 ml / Kulturschale aufpipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei 37°C wurden 22,5 ml Nährmedium pro Schale hinzugefügt und für weitere 48 Stunden bei

37°C inkubiert.

2.2.1.4. Isolieren der Kapside

Die infizierten Zellen wurden mit einem Zellschaber von der Unterfläche gelöst und die Zellsuspension in 500 ml Zentrifugierflaschen gesammelt. Nach einer Sedimentation mit 2500-facher Erdbeschleunigung ($g = 9,80665 \text{ m/s}^2$) für 10 Minuten, wurde der Überstand verworfen. Das restliche Nährmedium wurde ausgewaschen, indem die Zellen in 20 ml PBS (phosphate-buffered saline) resuspendiert und nach erneuter Zentrifugation wieder abgetrennt wurden.

Zum Aufschließen der Zellen und Isolierung der gebildeten L1-Virushüllproteine, wurde die Zellen in 10 ml PBS (1 M PBS, 0,5 mM MgCl_2 ; 0,9 mM CaCl_2) gelöst und einer intensiven Ultraschallbehandlung auf Eis unterzogen. Um die Zellen nicht zu überhitzen und ein Aufschäumen zu vermeiden, wurden die Beschallung fraktioniert und mit Kühlpausen durchgeführt. Das Ergebnis wurde lichtmikroskopisch kontrolliert.

Anschließend folgte eine Auftrennung dieser noch relativ groben Zellbestandteile über einen Cäsiumchloridgradienten. Dazu wurden 10,24 g Cäsiumchlorid hinzugefügt und die nukleare Suspension auf zwei flexible Zentrifugengefäße verteilt, die sich problemlos mit einer Nadel durchstechen ließen. Es folgte eine Ultrazentrifugation mit einem SW-41-Rotor bei 36000 U/min für 48 Stunden bei 4°C. Die einzelnen Bestandteile wurden so in verschiedene Banden aufgetrennt und die Viruskapside konnten mit Hilfe einer 5 ml Spritze und Kanüle durch das flexible Zentrifugengefäß hindurch abgesaugt werden. Die Dichte dieser Virus-Like Particles (VLPs) wurde mit einem Refraktometer von Bausch & Lomb gemessen und sollte zwischen 1,360 und 1,365 g/ml liegen.

2.2.1.5. Reinigen der Kapside

Zum Reinigen wurden die Kapside in Membranröhrchen überführt und an PBS über Nacht dialysiert. Als weiterer Schritt folgte eine Purifikation an einem Glukosegradienten. Dazu wurden eine 10% und eine 50% Glukoselösung mit 5 M NaCl, PBS und 5% NP-40 in 60°C heißem Wasserbad hergestellt. Nach einer Abkühlung auf 4°C wurden jeweils 5ml der Lösungen übereinander in ein Reagenzglas pipettiert, so dass zwei Phasen unterschiedlicher Konzentrationen entstanden. Durch langsames Umlegen der Röhrchen entstand ein gleichmäßiger Glukosegradient, worauf schließlich die Kapside aufgetragen wurden. Nach einer Zentrifugation über Nacht bei 36000 U / min, 4°C und einem SW-41-Rotor, wurde der Überstand verworfen und die gereinigten Kapside konnten für den Kapsid-ELISA verwendet werden.

2.2.2. Kontrolle der Kapside mit Western-Blot-Analyse

2.2.2.1. Prinzip des Western-Blots

Die Spezifität und die Konzentration der hergestellten typenspezifischen Kapside wurde mit einer Western-Blot-Analyse (Towbin et al., 1979) geprüft.

Zuerst wurde mit den Kapsiden eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt. Dabei wurden durch die Anwesenheit von SDS und Mercaptoethanol die Proteine negativ geladen und die Disulfidbrücken verringert. Durch Anlegen einer elektrischen Spannung wurden sie entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Anschließend wurden die separierten Moleküle elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran transferiert („geblotet“) und die freien Proteinbindungsstellen abgesättigt. Zur immunologischen Identifizierung wurden die Membranen mit monoklonalen Mausantikörper gegen die jeweiligen Kapsidtypen inkubiert. Nach intensivem Abwaschen der unspezifisch gebundenen Liganden erfolgte ein indirekter Nachweis mit einem zweiten (Anti-Maus)-Antikörper und einer daran gekoppelten Merrettich-Peroxidase katalysierten Fluoreszenzreaktion. Das Ergebnis wurde schließlich durch Autoradiographie auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht (siehe Abbildung 2.1).

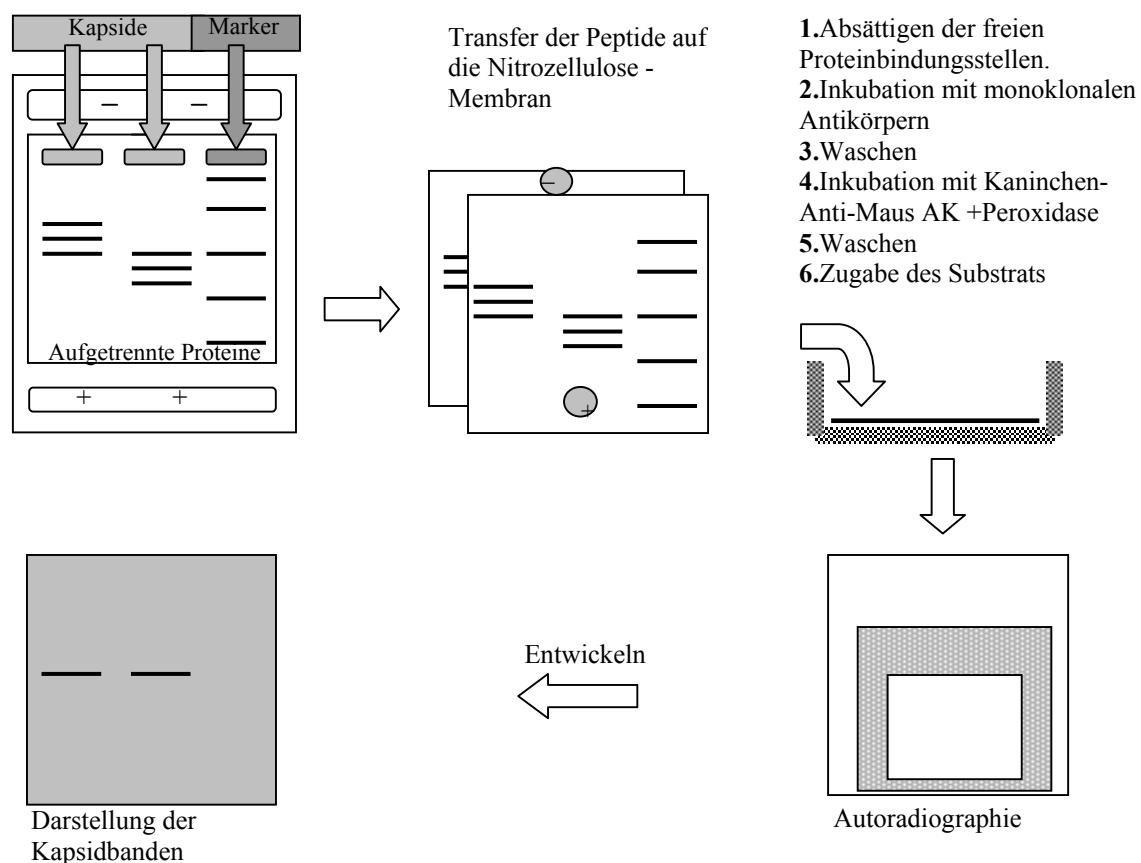


Abbildung 2.1.: Prinzip des Westernblots (Erklärung siehe Text).

2.2.2. Durchführung des Western-Blots

Für die gelelektrophoretische Auftrennung der Kapsidlösung wurde ein 10%-iges SDS-Polacrylamidgel hergestellt. 5 µl der Probe wurden in 5 µl Mercaptoethanol pipettiert und 5 µl Ladepuffer, bestehend aus 7% SDS, 20% Glycerol, 125 M Tris und 0,003 BPB, zugegeben. Zur Denaturierung der Proteine wurde der Ansatz für 5 Minuten bei 95°C auf einem Heizblock erwärmt und danach auf zwei verschiedene Gele jeweils 5 µl der gleichen Proben geladen.

Nach erfolgter Elektrophorese wurde das erste Gel mit einer 0,25%-igen Coomassie blue Lösung für eine halbe Stunde unter ständigem Schwenken gefärbt. Anschließend wurde der Hintergrund mit einer De-Stain-Lösung (30% Methanol, 10% Essigsäure) wieder entfärbt und danach luftgetrocknet.

Zum Transfer der Proteine wurden das zweite Gel zusammen mit einer Nitrozellulosemembran zwischen zwei Schwämme geklemmt, in eine Western-Blot-Kammer mit 300ml Transferpuffer (20% Methanol, 50mM Tris, 380mM Glycin, 0,1% SDS) positioniert und eine Spannung von 100 Volt bei 4°C angelegt. Nach einer Stunde wurde die Membran entnommen und die restlichen Proteinbindungsstellen für eine weitere Stunde in einer Plastikwanne mit PBST und 5% Milchpulverlösung abgeblockt. Es folgte eine einstündige Inkubation mit monoklonalen Antikörpern in einer Verdünnung von 1:1000 mit PBST und 0,5% Milchpulver. Ungebundene Liganden wurden durch viermaliges Waschen mit PBST entfernt. Der zweite Antikörper, das Kaninchen-Anti-Maus Immunglobulin, konjugiert mit Merettich-Peroxidase wurde im Verhältnis 1:40000 in PBST mit 0,5% Milchpulver gelöst und die Membran darin für eine weitere Stunde eingelegt. Nach viermaligen Waschen erfolgte die Detektion mit enhanced-chemiluminescence (ECL)-Färbelösung, die für eine Minute aufgetragen wurde. Schließlich wurde die Membran blasenfrei in eine Polyethylenfolie verpackt und zur Sichtbarmachung des Ergebnisses einem Röntgenfilm exponiert.

2.2.3. Das Kapsid-ELISA-Verfahren zur Testung der Patientinnen auf HPV

Antikörper

2.2.3.1. Prinzip des Kapsid-ELISAs

Alle Blutproben wurden auf das Vorhandensein von L1-IgG-Serumantikörpern der HPV-Typen 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35 und 45 mit dem bei Carter 1996 (Carter et al 1996) beschriebenen Kapsid-ELISA-Verfahren getestet (siehe Abb. 2.2.2.).

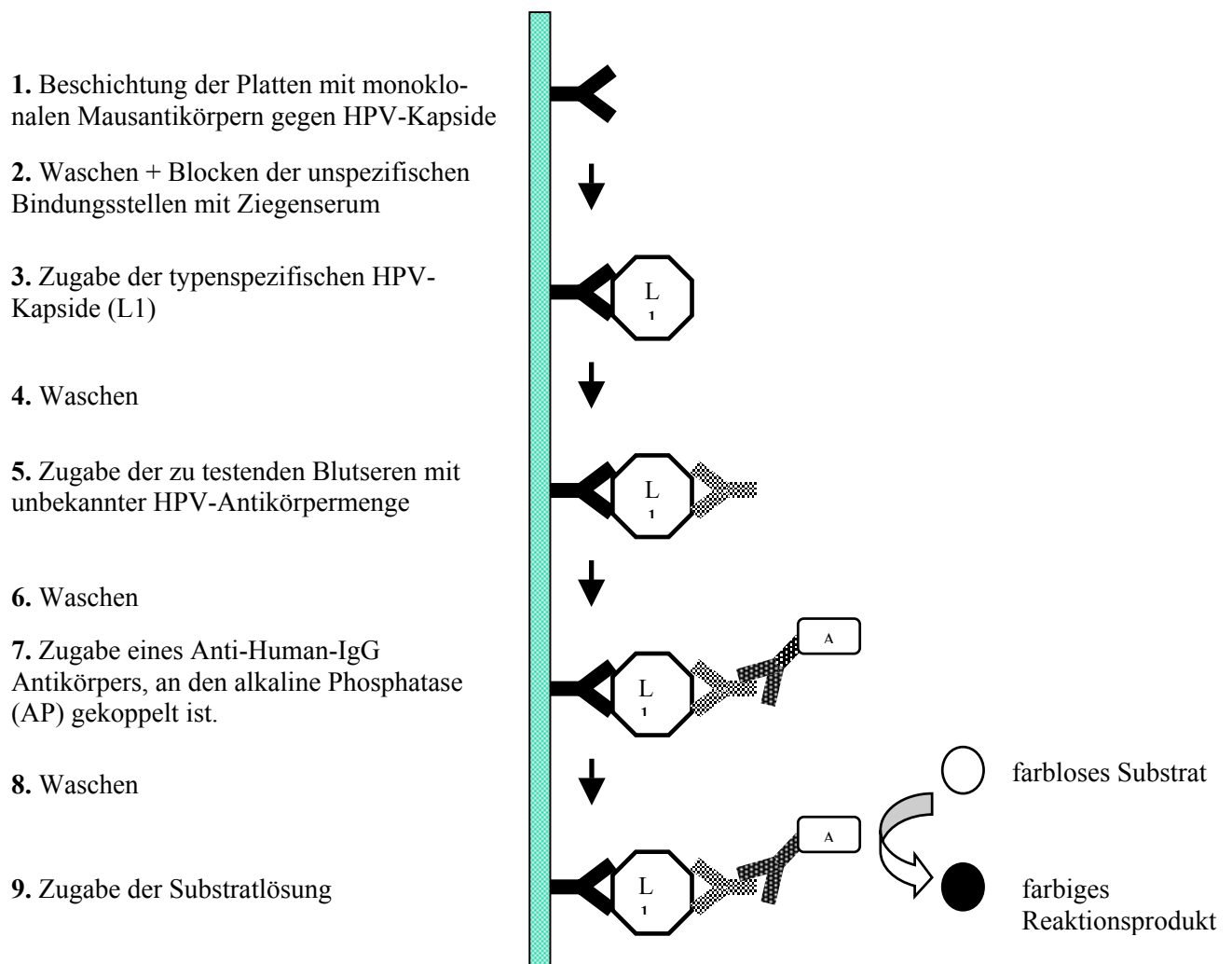


Abbildung 2.2.2: Prinzip des Kapsid-ELISAs (Erklärung siehe Text)

Zunächst wurden Mikrotiterplatten mit monoklonalen Mausantikörpern gegen jeweils ein typenspezifisches HPV-L1-Virushüllprotein beschichtet. Freie, nicht an die Plastikoberfläche der Vertiefungen gebundene Antikörper wurden ausgewaschen und die unspezifischen Bindungsstellen mit einer ziegenserumhaltigen Lösung abgeblockt. Anschließend wurden die

unter Punkt 2.2.1. beschriebenen Kapside hinzugefügt und von den Antikörpern gebunden. Nach einer weiteren Waschung wurden die zu testenden Blutseren aufgetragen. Waren Antikörper gegen den jeweiligen HPV-Typen enthalten, wurden diese an die Hüllproteine angelagert. Die Detektion erfolgte mit einer durch alkalische Phosphatase katalysierten Farbreaktion unter Zuhilfenahme eines zweiten Antikörpers (Anti-Human-IgG), an den dieses Enzym gekoppelt ist. Mit einem ELISA-Lesegerät konnte schließlich die Extinktion, und damit die relative Menge an Antikörpern, photometrisch bestimmt werden.

Durch das Auftragen der monoklonalen Mausantikörper vor den Kapsiden wurde eine sehr hohe Spezifität im Antikörpernachweis und ein niedriger unspezifischer Hintergrund erreicht.

2.2.3.2. Durchführung des Kapsid-ELISAs

Zur Beschichtung von 96-Mikrotiterplatten (Immulon-2, Dynatech Laboratories, Inc. Chantilly, VA, USA) wurden monoklonalen Mausantikörper mit 0,1 M Natriumkarbonatpuffer (pH 9,5) im Verhältnis 1/2000 verdünnt und in einem Volumen von je 50 µl/Vertiefung bei 4°C über Nacht inkubiert. Diese in Lebendmäusen hergestellten Antikörper gegen gereinigte Kapside, wurden freundlicherweise von Dr. Neil Christensen, Penn State Medical Center, Seattle, USA zur Verfügung gestellt.

Anschließend wurden die nicht an die Platte gebundenen Antikörper durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Es folgte eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur mit 100 µl PBST (PBS mit 0,05% Tween 20), das zusätzlich 10% Ziegeserum enthielt, um unspezifische Bindungsstellen der Titerplatte abzublocken. Danach wurden die Platten ausgeklopft und die in Punkt 2.2.1. beschriebenen HPV-L1-Virushüllproteine in der Mischung von 1/50 bis 1/200 (optimiert für jeden Kapsidtyp) in PBST plus 10% Ziegeserum hinzugefügt und für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren Waschzyklus mit PBS wurden die gewünschten Blutseren mit PBST/10% Ziegeserum im Verhältnis 1:100 verdünnt, mit einem Volumen von 50 µl aufgetragen und für eine Stunde bei 37°C in den Inkubator gestellt. Alle Blutseren wurden dreifach getestet, ein Tripel mit Kapsiden und ein Tripel ohne Kapside als Leerwert.

Nach einem wiederholten Waschvorgang wurden die Platten mit einer Ziegen Anti-Human-IgG konjugierten alkalischen Phosphatase (AP) (Boehringer-Mannheim, Indianapolis, IA, USA) in der Verdünnung 1/2000 für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Durch das Hinzufügen von 50 µl AP Substrat / Vertiefung wurde eine Farbreaktion gestartet und die Antikörperbindungen sichtbar gemacht. Nach einer 30-minütigen Inkubationszeit im Dunklen bei Raumtemperatur wurde durch Zugabe von 50 µl 1,5 M NaOH / Vertiefung die enzymatische

Reaktion gestoppt. Schließlich wurde mit Hilfe eines ELISA-Lesegerätes (Titertek Twin-reader) photometrisch bei 405 nm die Extinktion der Lösung in den einzelnen Vertiefungen der Mikrotiterplatte gemessen.

2.2.3.3. Auswertung der ELISA-Ergebnisse

Die ELISA Rohwerte wurden logarithmiert, um die Werte besser einer Gaußschen Normalverteilung anzunähern. Der Median der Tripel ohne Kapside wurde von dem Median der Tripel mit Kapsiden subtrahiert. Zur Reduzierung von Fehlerquellen und Egalisierung kleiner Schwankungen zwischen verschiedenen Versuchsansätzen wurden nach Möglichkeit alle Seren einer Patientin auf der selben Mikrotiterplatte getestet. Alle Platten enthielten außerdem eine positive und eine negative Serumkontrolle.

Zur Festlegung des Grenzwertes für ein positives ELISA-Ergebnis, wurden die Messwerte von Blutseren präpubertärer Mädchen aus der Pädiatrie verwendet. Von diesen wurde angenommen, dass noch keine Exposition gegenüber genitalen HPV-Typen stattgefunden hat. Der Grenzwert für ein positives Ergebnis wurde festgelegt als Mittelwert dieser ELISA-Ergebnisse plus zwei Standardabweichungen.

2.2.4. HPV Consensus Primer PCR/ Reverse-Line-Blot Verfahren zur Analyse auf HPV-DNA im Zervixabstrich

2.2.4.1.Prinzip der HPV-DNA-Analyse

Die Genotypisierung der HPV-DNA aus den Zervixabstrichen wurde mit einem HPV-Consensus-Primer PCR/ Reverse-Line-Blot-Verfahren durchgeführt. Dabei handelt es sich um ein noch nicht kommerziell erhältliches Testverfahren, dass freundlicherweise von der Firma Roche-Molecular Systems, Alameda, CA, USA zur Verfügung gestellt wurde (Gravitt et al., 1998, 2000). Dieses Verfahren bietet die Möglichkeit auf 27 spezifische HPV-DNA-Typen gleichzeitig zu testen. Dazu wurde zunächst die DNA aus den Zellen der HPV-Zervixabstriche extrahiert. Mit Hilfe einer Polymerase-Kettenreaktion wurde ein Fragment aus der L1-Genregion amplifiziert und die Proben zur Auswertung gelelektrophoretisch aufgetrennt. Abstriche mit positiven HPV-Befund wurden mit Hilfe von Teststreifen typisiert. Der Nachweis erfolgte dabei mit typenspezifischen HPV-Sonden im Sinne einer reversen Hybridisierung. Die Hybride auf den Streifen wurden mit einer Streptavidin konjugierten Peroxidase, die eine geeignete Farbreaktion katalysiert, sichtbar gemacht. Im Vergleich mit einer Schablone konnten schließlich die Teststreifen ausgewertet werden.

2.2.4.2.Extraktion der DNA

Aus dem Transportmedium der HPV-Abstriche wurde zunächst die DNA extrahiert. Um die Zellen aufzuschließen, wurde zu je 1 ml Probe 10 µl Proteinase K plus 1 µl Tween 20 hinzugefügt und für eine Stunde bei 56°C im Thermoblock inkubiert. Anschließend wurden 300 µl der enzymatisch umgesetzten Lösung zu 1 ml Ethanol mit Natriumacetat (Verhältnis 1:30) hinzugefügt und bei -20°C über Nacht stehen gelassen. Die nun ausgefällte DNA wurde bei 13 000-facher Erdbeschleunigung ($g = 9,80665\text{m/s}^2$) für 30 min zentrifugiert und der Überstand mit einer 5 ml Spritze abgesaugt und verworfen. Das Pellet wurde bei Raumtemperatur über Nacht getrocknet und danach in 150 µl steril filtriertem TE (10mM Tris, 1mM EDTA, pH 7,9) resuspendiert. Es folgte eine Erwärmung auf 95°C, um die Proteinase K zu inaktivieren. Schließlich wurde die DNA bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert.

2.2.4.3. HPV-L1 Consensus Primer PCR zur Amplifikation der HPV-DNA

2.2.4.3.1. Prinzip der Amplifikation

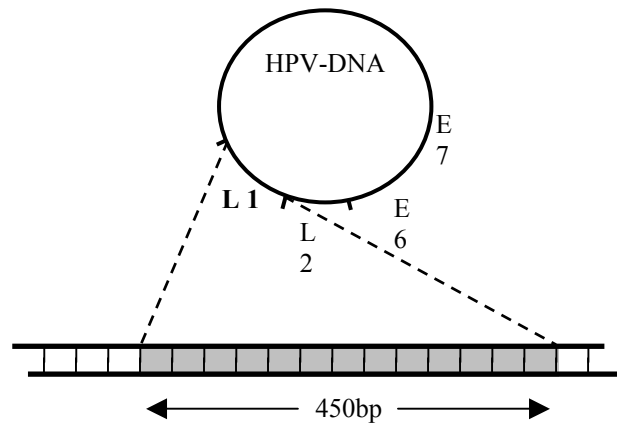
Zum Nachweis von HPV-DNA wurde ein etwa 450 Basenpaar langes Fragment aus der L1-Genregion des humanen Papillomavirus, mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert. Dazu wurde eine Reaktionsgemisch aus monomeren Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTPs), hitzestabiler Taq-Polymerase, der extrahierten DNA und den biotinylierten L1 Primerpools PG MY09 für den negativen Strang und PG MY11 für den positiven Strang verwendet. Diese Oligonukleotid-Primer binden an dieselbe Genregion, wie das von Manos et al. 1989 entwickelte Consensus Primerpaar MY09 (CGTCCMARRGGAWACTG-ATC) und MY11 (GCMCAGGGWCATAAYAATGG) (Manos et al., 1989). Im Gegensatz zu MY09 / MY11, die an verschiedenen Positionen degeneriert sind, um somit an die meisten HPV-Typen binden zu können (M steht für A + C, R steht für A + G, W steht für A+T, Y steht für C+ T), besteht PG MY09 aus einer Gruppe von dreizehn und PG MY11 aus einer Gruppe von fünf Primern die exakt an alle 27 zu untersuchenden HPV-Typen angepasst sind. Dadurch wurde eine höhere Sensitivität und Spezifität des typenspezifischen Nachweises erreicht. (Gravitt et al., 2000).

Zur Kontrolle ausreichender DNA-Menge in den Proben, wurde im gleichen Ansatz genomische DNA bzw. stellvertretend β -Globin (268-bp) unter Verwendung der ebenfalls biotinylierten Primerpaar B PC 04 (CAACTTCATCCACGTTTACC) und B PC GH20 (GAAGAGCCAAGGACAGGTAC) nachgewiesen.

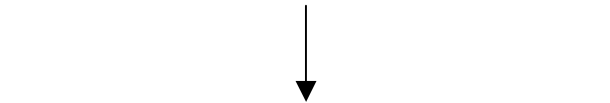
Die Amplifizierung wurde in einem programmierbaren Thermocycler durchgeführt. Dabei wurden die DNA-Doppelstränge mit einer Temperatur von 95°C aufgetrennt (*Denaturation*) und in einem zweiten Schritt bei 55°C die eingebrachten Oligonukleotid-Primer als Startkodons angelagert (*Annealing*). Schließlich wurden, ausgehend von den Primern, mit Hilfe der Taq-Polymerase, die komplementären Nukleotide bei 72°C in 5' → 3' Richtung zu einem Doppelstrang ergänzt (*Extension*). Insgesamt 40 Zyklen durchlief jede Probe, wodurch die gewünschten Genfragmente exponentiell vermehrt wurden (siehe Abb.2.2.3.).

Die PCR-Produkte wurden schließlich agarose-gelelektrophoretisch aufgetrennt, mit Ethidiumbromid vernetzt und anhand der Bandenstruktur unter UV-Licht ausgewertet.

Zu amplifizierender DNA-Doppelstrang aus dem L1 Open Reading Frame.

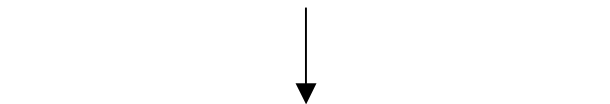


1. Denaturierung: Aufspalten der DNA-Doppelstränge bei 95°C



2. Annealing: Anlagerung der Primer bei 55°C

3. Extension: Synthese der komplementären Stränge bei 72°C in 5' zu 3' Richtung



Verdopplung der DNA-Stränge mit jedem Zyklus (Ingesamt 40) Zyklen

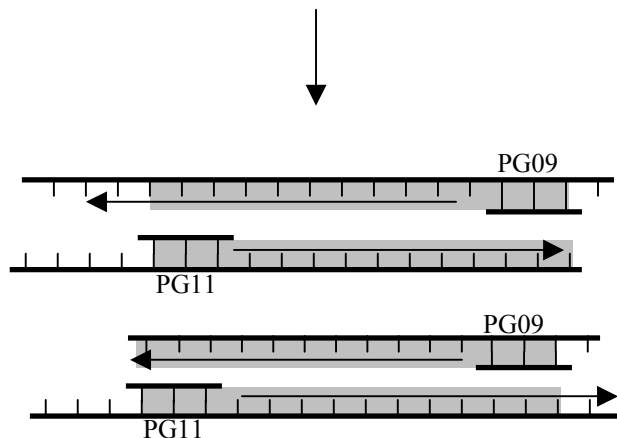


Abbildung 2.3.: Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Erklärung siehe Text.

2.2.4.3.2. Durchführung der Amplifikation

Zur Herstellung des Reaktionsgemisches (Mastermix) wurden neben 5 µl extrahierter DNA, jeweils 2 µl des Primerpools PG MY9 und PG MY11 in der Konzentration von 25 µM, jeweils 0,05 µl der Primer B PC 04 und B GH 20 in der Konzentration von 50 µM, 1,5 µl Amplitaq Gold (5U/µl), die monomeren Desoxyribonukleotide dATP, dCTP, dGTP jeweils in der Konzentration von 10mM und dUTP in der Konzentration von 30mM gesamt als 2 µl dNTP-Mix, 16 µl MgCl₂ in der Konzentration von 25mM, 10 µl 10x PCR-Puffer und 61,4 µl destilliertes H₂O auf Eis in ein Eppendorf Reaktionsgefäß pipettiert. Das Gemisch wurde mit 50µl Mineralöl bedeckt, um Evaporation zu vermeiden. Von besonderer Bedeutung war die Konzentration von MgCl₂. Je höher diese Konzentration ist, desto unspezifischer werden die DNA Moleküle angelagert (Gravitt et al., 2000).

Anschließend wurden die Reaktionsgefäße in einen programmierbaren DNA Thermal Cycler von Perkin Elmer gestellt und die DNA in 40 Zyklen mit folgendem Schema amplifiziert: Denaturation für 1 min bei 95°C, Annealing für 1 min bei 55°C und Extension für 1 min bei 72°C. Begonnen wurde die Zyklen mit einer 9 minütigen Denaturation bei 95°C und beendet mit einer 5 min Extension bei 55°C. Zum Schluß folgte eine Abkühlung des Gerätes auf 15°C bis zur Entnahme der Reaktionsgefäße.

Ein Teil jedes PCR-Produktes wurde anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt. Dabei wurde ein 3%iges Agarosegel verwendet, das mit 3µl Ladepuffer (3-[N-Morpholino] Propan-sulfonsäure) und 12 µl amplifizierter DNA beladen wurde. Die Auftrennung erfolgte in einer horizontalen Gelkammer, an die eine Spannung von 90 Volt angelegt wurde. Nach Einlegen des Gels in einer 0,1 % Ethidiumbromidlösung, welche in der Nukleinsäure interkaliert, konnte eine β-Globinbande und gegebenenfalls eine HPV-Bande unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Proben mit positivem HPV-Befund wurden schließlich mit dem Reverse-Line-Blot-Verfahren (siehe unten) typisiert.

Bei jedem PCR-Ansatz wurden zwei Negativkontrollen mitgeführt, bestehend aus einer Extraktionskontrolle (Mamazellen) und eine Pufferkontrolle (Reaktionsreagenz ohne DNA). Als Positivkontrolle dienten Si-Ha-Zellen die in ihrem Genom HPV-16-DNA enthalten. Zur Vermeidung einer Kontamination wurde eine strikte räumliche Trennung aller Arbeitsgänge (Nukleinsäureextraktion, Herstellung des Reaktionsansatzes, Amplifikation und Produktanalyse) vorgenommen.

2.2.4.4. HPV-DNA-Typisierung mit Reverse-Line-Blot-Verfahren

2.2.4.4.1. Prinzip der Reverse-Line-Blot-Typisierung

Zur Genotypisierung der HPV-DNA wurden Plastikstreifen mit Testbanden für 27 verschiedene HPV-Typen verwendet (16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 42, 45, 51 bis 59, 66, 68, MM4, MM7, MM8, und MM9, 6, 11, 40, 42, 53, 54, 57, 66, MM8). Zwei weitere Linien zeigten die Konzentration für β -Globin an und unterteilten gleichzeitig in HPV-Typen mit niedrigem und HPV-Typen mit hohem Karzinomrisiko (Einteilung nach Bosch et al., 1995). Um die Auswertung zu erleichtern, war auf jedem Teststreifen eine schwarze Referenzlinie angezeichnet (siehe Abbildung 2.2.4.).

Der HPV-Nachweis auf den Testlinien erfolgte im Sinne einer reversen Hybridisierung. Mit Denaturierungslösung wurden die amplifizierten, durch die biotinylierten Primer markierten DNA-L1-Fragmente in Einzelstränge aufgespalten. Diese wurden anschließend mit auf den Teststreifen aufgetragenen typenspezifischen HPV-DNA-Sonden inkubiert. Nicht gebundene Einzelstränge wurden abgewaschen und die Hybride mit Hilfe von Streptavidin-Meerettich, das an Biotin bindet, sichtbar gemacht.

2.2.4.4.2. Durchführung der Reverse-Line-Blot-Typisierung

Zur Trennung der DNA-Stränge wurden die PCR-Produkte mit einer Denaturierungslösung (EDTA, 1,6% NaOH und Thymolblau) im Verhältnis 1:1 verdünnt wurden. Die Teststreifen wurden je in ein Fach des Typisierungstabletts (Perkin-Elmar) gelegt und jeweils mit 3 ml, 53°C warmer Hybridisierungslösung (4 x SSPE mit 0,1% SDS; 1 x SSPE enthält: 0,18 M NaCl, 10 mM NaH₂PO₄, 1mM EDTA, pH 7,7) bedeckt. 75 μ l des denaturierten PCR-Produktes wurde hinzugefügt und das Tablett im Wasserbad bei 53°C und 50 rpm (rabel per minutes) für 30 Minuten gerüttelt. Anschließend wurde die Hybridisierungslösung verworfen und die nicht gebundene DNA durch zweimaliges Waschen mit SSPE und 0,1% SDS entfernt.

Zur Detektion der biotinylierten Hybride wurden die Streifen in einer Lösung aus 0,3 % Streptavidin-Meerettich, SSPE und 0,1% SDS für 30 Minuten bei 70 rpm und Raumtemperatur auf einem Rüttler inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurden jeweils 3 ml einer 0,1 M Zitratlösung in jedes Fach gegeben. Zur Auslösung der Farbreaktion wurden die Streifen in einer 4:1 Mischung aus Substrat A (0,01% Wasserstoffperoxid und 0,01% Proclin in Citratpuffer) und Substrat B (0,01% 3, 3', 5, 5'-tertamethylbenzidine) für 5 Minuten bei Raumtemperatur und 70 rpm inkubiert. Mit Hilfe einer Schablone wurden die Tests schließlich ausgewertet und zur Archivierung fotografiert (siehe Abbildung 2.2.4.).

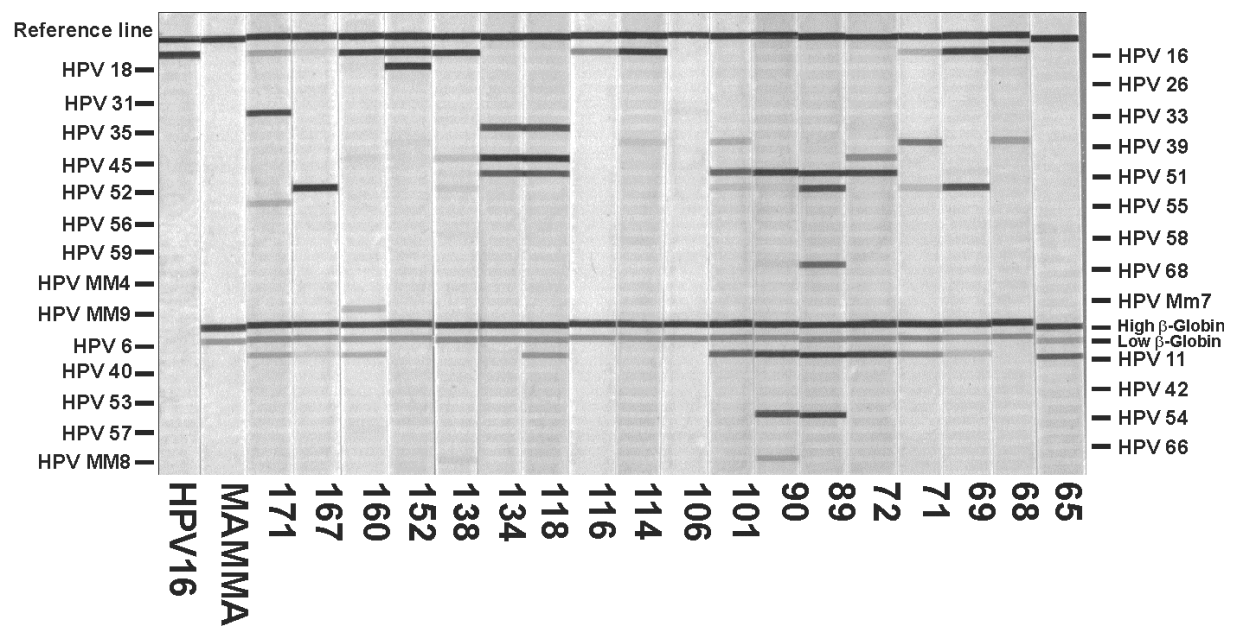


Abbildung 2.2.4.: Beispiel einer Reverse-Line-Blot-Genotypisierung mit Hilfe einzelner Teststreifen von Roche Molecular Systems, die in der Abbildung aneinandergelegt wurden. Jeder Teststreifen entspricht der HPV-DNA-Typisierung eines Zervixabstriches.

2.2.5. Statistische Auswertung

Die in den Experimenten gewonnenen Daten wurden mit dem Statistikprogramm SPSS für Windows Version 11.0 auf einem Personal Computer (PC) ausgewertet. Zur graphischen Darstellung der Ergebnisse diente neben SPSS das Tabellenkalkulationsprogramm Excel 2000 und das Präsentationsprogramm PowerPoint 2000.

Bei der statistischen Auswertung der ELISA-Daten wurde angenommen, dass diese normalverteilt sind. Die Mittelwerte festgelegter Gruppen, wurden mit Hilfe des t-Tests für unabhängige Stichproben miteinander verglichen. In Fällen, in denen die Annahme der Normalverteilung nicht aufrechterhalten werden konnte, wurde der Mann-Whitney-U-Test angewendet. Zur statistischen Auswertung bei nicht parametrischen Tests mit verbundenen Stichproben wurde der Wilcoxon-, 2-seitige-exakt Test beziehungsweise bei dichotomen Werten, der Mc Nemar, 2-seitige-exakt-Test angewendet.

Zur Analyse von Zusammenhängen zweier oder mehrerer „absoluter“ Variablen wurden Chi-Quadrat-Tests und Kreutztabellen angewendet. Das Ergebnis wurde bei nur zwei Variablen, als p-Wert im 2-seitigen Fisher-Exakt-Test und bei mehreren Variablen als p-Wert nach Pearson angegeben. Die Stärke des Zusammenhangs wurde als Spearmanscher Korrelationskoeffizient angegeben. Eine qualitative Auswertung der Kreuztabellen erfolgte als beschreibende Statistik mit Hilfe der Größen Sensitivität, Spezifität und Validität sowie positiver prädiktiver Wert und negativer prädiktiver Wert.

Für alle angewendeten statistischen Tests wurde ein Zusammenhang als signifikant angesehen, wenn der p-Wert kleiner gleich 0,05 war. Von einer „Tendenz“ wurde bei einem p-Wert zwischen 0,05 und 0,1 ausgegangen.

3. Ergebnisse

3.1. Prävalenz von HPV-Kapsid-Antikörpern und HPV-DNA

3.1.1. Prävalenz von HPV-Kapsid-Antikörpern im Serum

Die 178 Blutseren von den 52 ausgewählten Patientinnen wurden auf das Vorkommen acht typenspezifischer HPV-Antikörper (HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 45) untersucht. Dabei zeigten 90,4% der Proben, die beim Erstbesuch in der I. UFK abgenommen wurden, Seroreaktivität gegen mindestens einen der berücksichtigten HPV-Genotypen. Die gleichzeitige Prävalenz von wenigstens zwei verschiedenen Antikörpern in einer Probe wurde in 76% der positiven Fälle beobachtet.

Der häufigste Antikörpertyp war HPV 16, der bei 50,0% der Frauen gefunden wurde. Antikörper gegen HPV 45 konnten bei 42,3%, gegen HPV 35 bei 40,4%, gegen HPV 11 bei 36,5%, gegen HPV 18 bei 34,6%, gegen HPV 33 und HPV 6 bei jeweils 25,0% und gegen HPV 31 bei 19,2% der Patientinnen detektiert werden. Zusammengenommen konnten somit bei 25 Frauen (48,1%) Antikörper gegen „low-risk“ HPV-Typen (HPV 6 und 11) und bei 45 (86,5%) gegen „high-risk“ HPV-Typen (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 45) nachgewiesen werden. Antikörper sowohl gegen high-risk als auch gegen low-risk HPV-Typen gleichzeitig waren bei 24 Patientinnen (46,2%) vorhanden.

Beim Vergleich der Antikörperprävalenz des ersten und letzten Besuchs, stellte sich eine leichte Abnahme der Seroreaktionen im Untersuchungszeitraum (zwischen 3 und 71 Monaten; durchschnittlich 2,6 Jahre) dar (siehe Abbildung 3.1.1.1.).

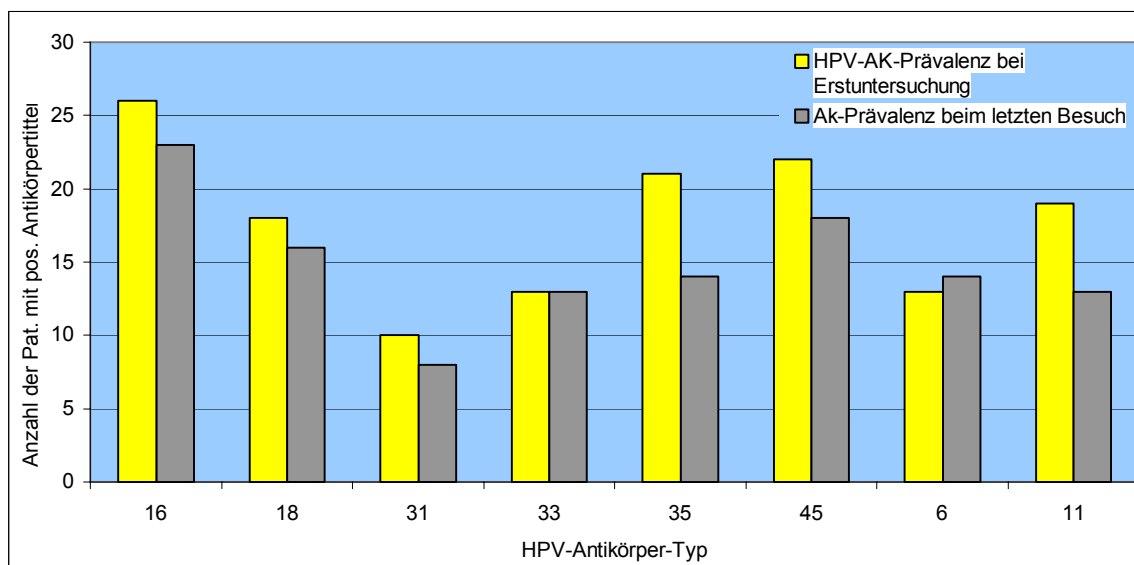


Abbildung 3.1.1.1: Antikörperprävalenz der Patientinnen beim ersten und letzten Besuch.

Wie Abbildung 3.1.1.2. zeigt, hatten bei der Erstuntersuchung 21,1% der Patientinnen gegen nur einen HPV-Typen, 15,4% gegen zwei, 21,1% gegen drei, 13,5% gegen vier, 10,0% gegen fünf und 7,7% sogar gegen sechs verschiedene HPV-Genotypen zum gleichen Zeitpunkt Antikörper im Serum. Somit waren durchschnittlich bei jeder Probandin Antikörper gegen drei der acht untersuchten HPV-Typen gleichzeitig nachweisbar.

Das Antikörperspektrum in der Population war während des Untersuchungszeitraums einem stetigen Wandel unterworfen, wie der Vergleich der Kurve des ersten und letzten Besuches mit der maximalen Antikörperanzahl im Beobachtungszeitraum verdeutlicht (siehe Abbildung 3.1.1.2). Nur eine Patientin blieb während der gesamten Studie negativ für jeden der acht untersuchten Antikörper.

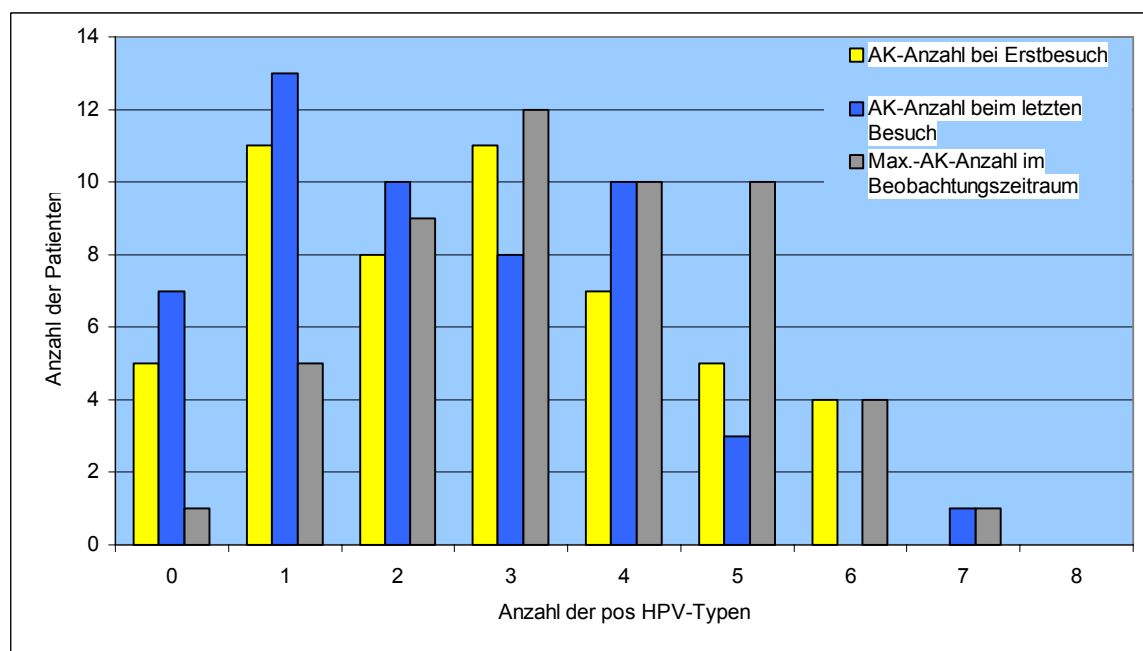


Abbildung 3.1.1.2: Antikörper gegen mehrere HPV-VLPs (virus-like particles) gleichzeitig. Beim ersten Besuch, letzten Besuch und die maximale Anzahlen Antikörper der Patientinnen während des Beobachtungszeitraums.

Die Veränderungen der Antikörpertiter erfolgten nur sehr selten abrupt. Vielmehr zeigte sich, bei Betrachtung der Einzelverläufe, ein kontinuierlicher eher fließender Wandel. In Abbildung 3.1.1.3. sind exemplarisch die Antikörper- und DNA-Nachweise, sowie die Ergebnisse der Pap-Abstriche und histologischen Untersuchungen einer Patientin im Verlauf dargestellt. Insgesamt wurde diese Frau über drei Jahren beobachtet, wobei sieben Serum-

proben zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen wurden. Eine „Serokonversion“, also ein Antikörpertiteranstieg von negativ auf positiv, war in diesem Beispiel bei HPV 35, von der ersten auf die zweite Probe zu beobachten. Plötzlich abfallende Seroreaktionen, sogenannte „Drops“, wurde zum Beispiel bei HPV 6 am zweiten und HPV 35 am dritten Untersuchungszeitpunkt gesehen.

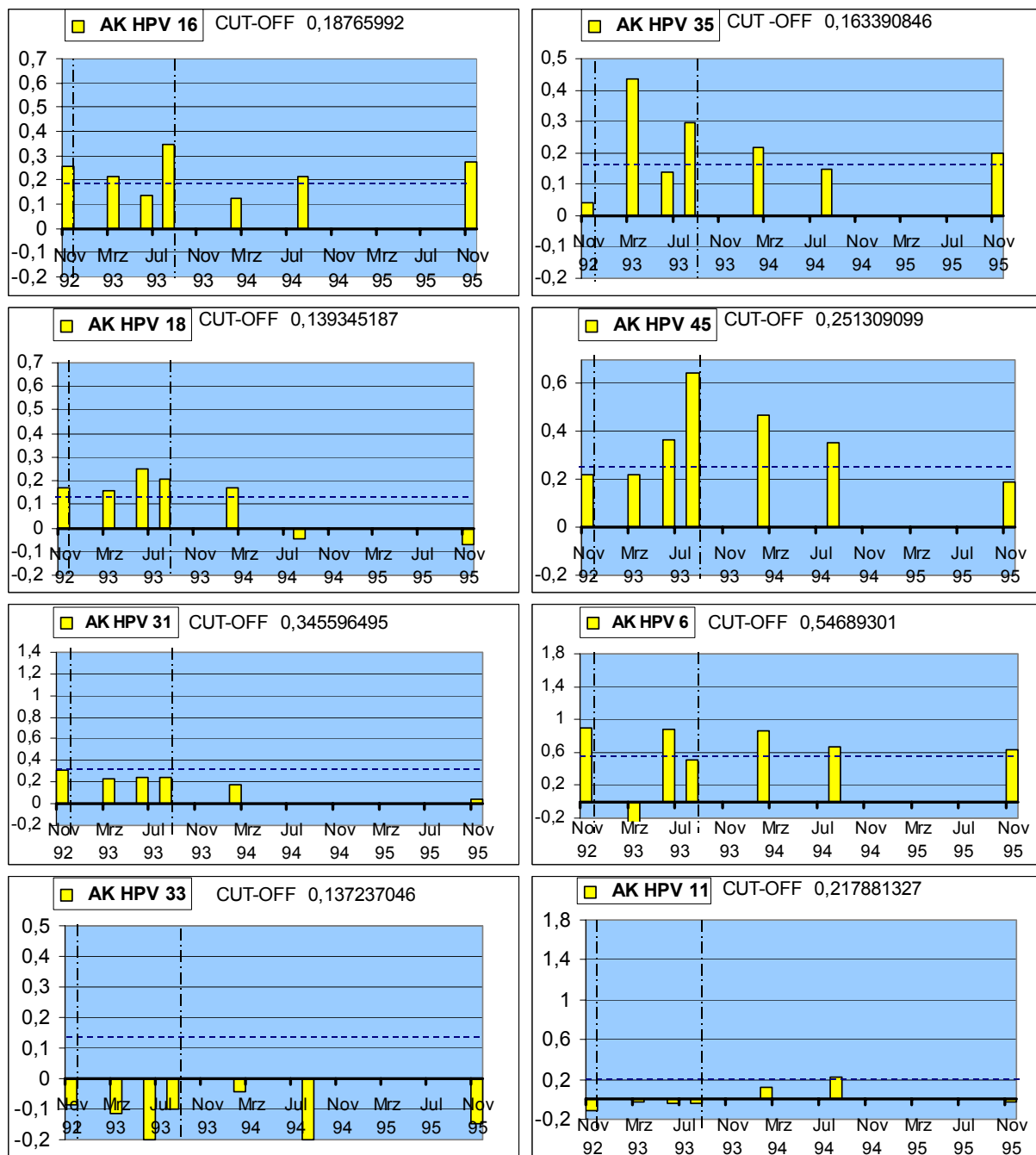


Abbildung 3.1.1.3 a: Verlauf der Antikörperreaktionen einer exemplarischen Patientin (geboren 20.09.65) über den Beobachtungszeitraum von drei Jahren. (Senkrecht gestrichelte Linie: chirurgische Intervention an der Zervix; quer gestrichelte Line: Grenzwert für positiven Antikörperstatus; gelbe Balken: ELISA-Werte)

| UDAT | 16 DNA | 18 DNA | 31 DNA | 33 DNA | 35 DNA | 45 DNA | 6 DNA | 11 DNA | Zytologie | Histologie | OP | Zervix |
|-------------------|-----------|-----------|-----------------|-----------|-----------|------------------|----------|-----------|-----------|----------------------|----------|-----------|
| 02.11.92 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | IV (III) | | | |
| 04.11.92 | | | | | | | | | | CIN II | | PA/CC |
| 02.03.93 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | IV a | | | |
| 08.06.93 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | III D | | | |
| 10.06.93 | | | | | | | | | | | Laserung | |
| 31.08.93 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | II | | | |
| 17.02.94 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | III | | | |
| 02.08.94 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | II | | | |
| 21.11.95 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | IV a | | | |
| 19.01.96 | | | | | | | | | | CIN III | | PA/CC +L. |
| 16.04.96 | | | | | | | | | II | | | |
| 19.11.96 | | | | | | | | | II | | | |
| 15.04.98 | | | | | | | | | II | | | |
| Erste Dysplasie | | | 1992 | | | Nikotin | | | | Nichtraucherin | | |
| Frühere gyn. OP | | | frakt.Kürettage | 1990 | | Antikonzepktion | | | | >15.Lebensjahr Pille | | |
| Schwangerschaften | | | 1990 und 1992 | | | Gewicht nach BMI | | | | Normalgewichtig | | |
| Menarche | | | 12. Lebensjahr | | | Schulbildung | | | | Realschulabschluss | | |

Abbildung 3.1.1.3 b: Gleichzeitig zur Serumentnahme gemessene HPV-DNA-Nachweise aus den Zervixabstrichen (1 = positiver DNA-Nachweis; 0 = negativer DNA-Nachweis) sowie histologische und zytologische Ergebnisse (Klassifikation siehe 2.1.1.) der Patientin aus Abbildung 3.1.1.3 a. Unterhalb der Tabelle sind die aus der Anamnese erhobenen Daten aufgelistet.

3.1.2. Prävalenz von HPV-DNA im Zervixabstrich

Unter den 52 Abstrichen, die beim Erstbesuch der Frauen in der I.UFK gleichzeitig mit dem Serum entnommen wurden, waren 98% HPV-DNA positiv für mindestens einen der 27 untersuchten Genotypen. Wie bereits beim Antikörpernachweis aus den Blutseren, konnte auch in den Zervixabstrichen, das Nebeneinander verschiedener HPV-DNA-Typen häufig beobachtet werden. 73% der Frauen wiesen Mehrfachinfektionen auf, wobei im Durchschnitt drei verschiedene Genotypen in einer Probe gefunden wurden (siehe Abb. 3.1.2.2.). Der mit Abstand am häufigsten detektierte HPV-DNA Typ war 16, der bei 65,4% der Patientinnen gefunden wurde. Am zweithäufigsten waren HPV 52, 58 und 6 mit jeweils 23,1% positiven Nachweisen. Als dritthäufigstes, allerdings nur mit wenig geringerer Prävalenz, wurden HPV 18 und HPV 51, mit jeweils 21,2%, gefunden, gefolgt von HPV 45 mit 15,4%, HPV 56, 59 und 11 mit jeweils 9,6%, HPV 33, 39, 55 und MM9 mit jeweils 5,8% und HPV 35, MM7 und 54 mit jeweils 3,8%. Am seltensten waren die HPV Typen 31, 26, 53, 66, und MM 8 mit jeweils 1,9% positiven Nachweisen. Die HPV Typen 68, MM4, 40, 42, und 57 konnten in unserer Population zumindest nicht beim Erstbesuch, detektiert werden. Somit waren 38,5% positiv für mindestens ein „low-risk“ und 94,3% positiv für mindestens einen „high-risk“ HPV-DNA-Typ. Vergleicht man diese Zahlen mit dem DNA-Nachweis am letzten Besuch, so nahm die absolute Prävalenz der HPV-DNA, trotz chirurgischer Interventionen, in der Studienpopulation leicht zu (siehe Abbildung 3.1.2.1.).

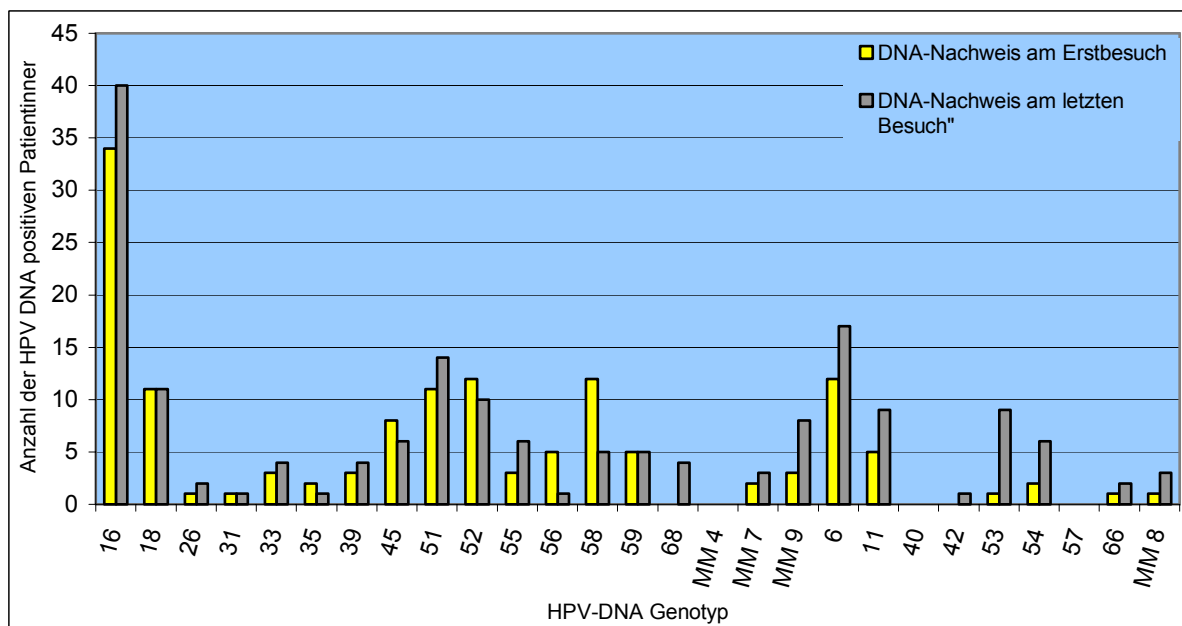


Abbildung 3.1.2.1.: HPV-DNA Prävalenz im Zervixabstrich der Patientinnen beim ersten und beim letzten Besuch.

In Abbildung 3.1.2.2. ist dargestellt wie viel HPV-DNA-Typen, bezogen auf die acht bei den Antikörpern berücksichtigten Genotypen, jeweils gleichzeitig in einem Abstrich nachgewiesen werden konnten. Zu sehen ist, dass hier das HPV-Spektrum während des Beobachtungszeitraums etwa gleich blieb. In der Darstellung der Gaußschen Normalverteilungen zeigt sich allerdings die Kurve der „maximalen DNA-Typen“ im Beobachtungszeitraum wesentlich weiter rechts verschoben als die des „letzten Besuches“. Dies macht deutlich, dass der nur kurze Nachweis von HPV-DNA-Typen, ein häufig beobachtetes Phänomen ist.

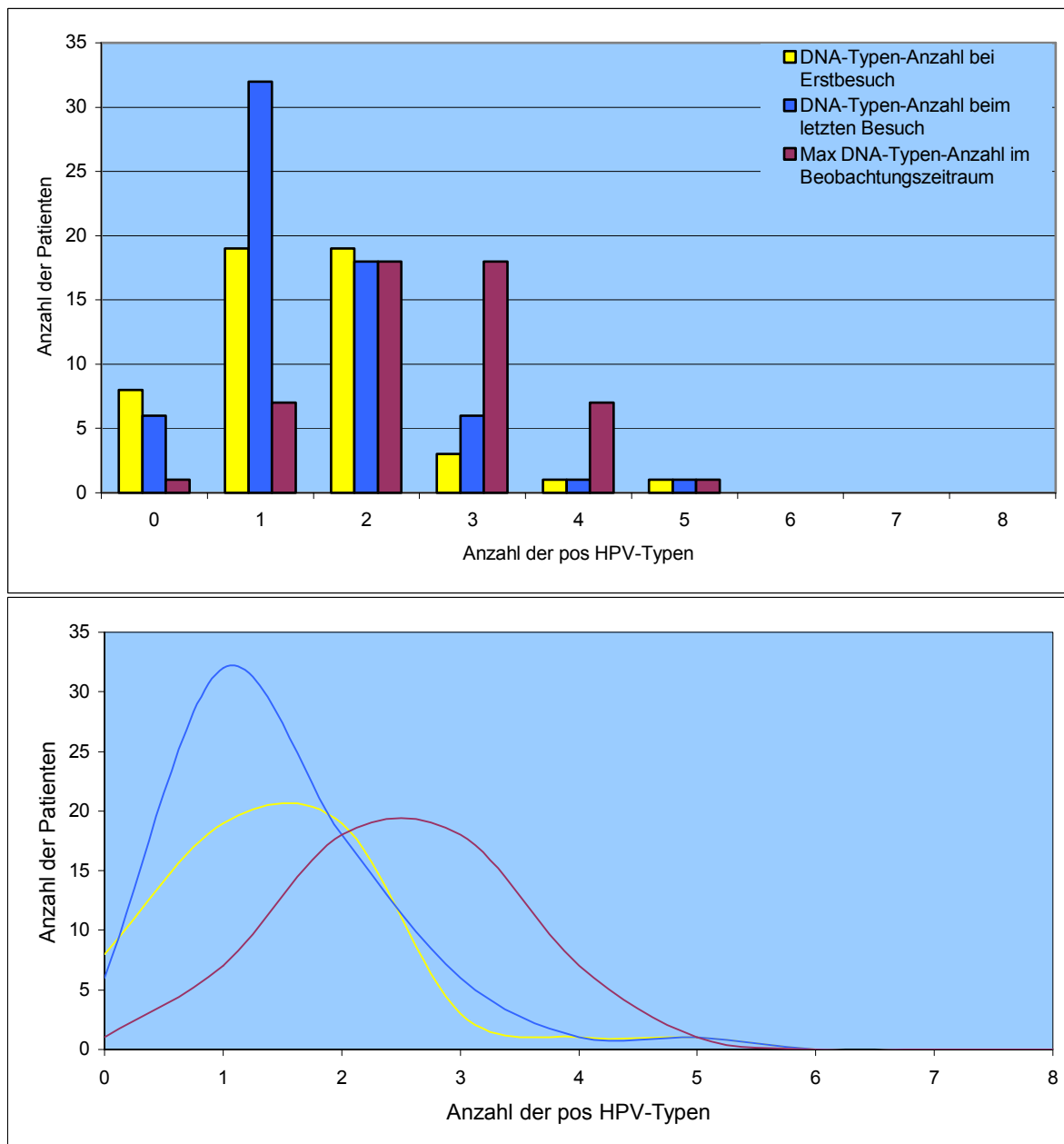


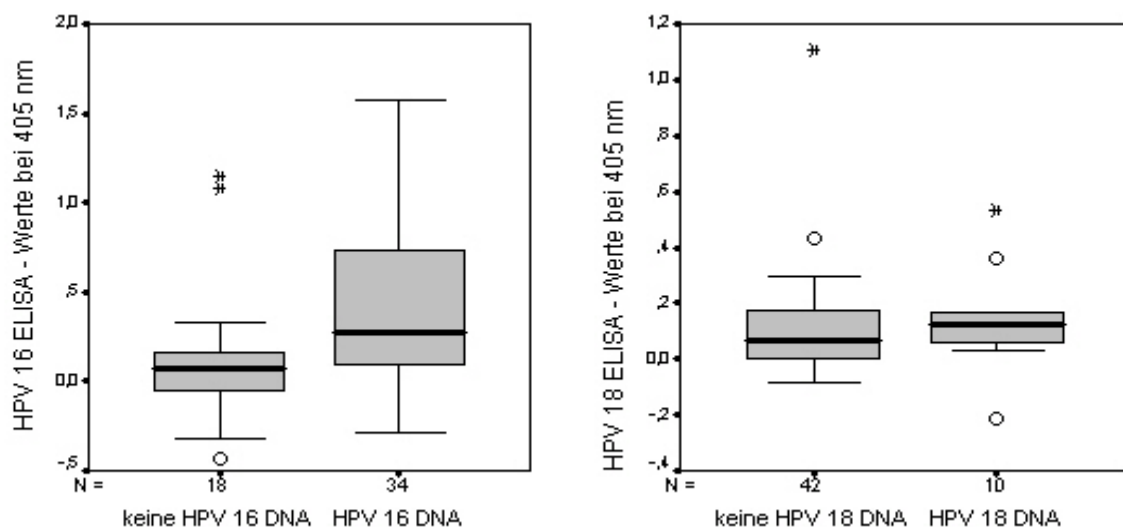
Abbildung 3.1.2.2.: Anzahl der HPV-DNA-Typen, die jeweils in einem Abstrich gleichzeitig nachgewiesen werden konnten, als Säulen- und als Liniendiagramm. Dargestellt sind die Anzahl beim Erstbesuch, beim letzten Besuch und die maximale Anzahl innerhalb des Beobachtungszeitraums. Berücksichtigt wurden nur die acht HPV-Genotypen, auf die auch beim Antikörpernachweis getestet wurden.

3.2. Vergleich der ELISA-Ergebnisse mit der parallel im Zervixabstrich gefundenen HPV-DNA

Um zu sehen in wie weit spezifische IgG-Serumreaktionen gegen virus-like particles (VLPs) einen Nachweis für eine HPV-Infektion darstellen, wurden die Prävalenz von HPV-DNA (16, 18, 31, 33, 35, 45, 6 und 11) im Zervixabstrich mit dem entsprechenden Antikörperspektrum korreliert.

Die typenspezifischen HPV-Serumreaktionen zum Zeitpunkt des Erstbesuches sind in Abhängigkeit vom gleichzeitig gemessenen HPV-DNA-Status in Abbildungen 3.2.1. dargestellt. Die maximalen und minimalen ELISA-Werte, die erste und dritte Quartille, sowie der Median sind an Hand einer Boxplotdarstellung an der y-Achse angetragen. Dabei sind die Werte von Patientinnen mit HPV-DNA jeweils denen ohne HPV-DNA-Nachweis, auf der x-Achse, gegenübergestellt.

In den Gruppen mit jeweils typenspezifischem HPV-DNA-Nachweis, lagen die Mediane der ELISA-Werte des entsprechenden HPV-Genotyps höher als in den Gruppen ohne jeweiligen HPV-DNA-Nachweis. Einzige Ausnahme bildete HPV 31, wofür jedoch nur eine Frau DNA-positiv getestet wurde, und daher der Wert nicht als repräsentativ gelten kann. (siehe Abbildung 3.2.1.)



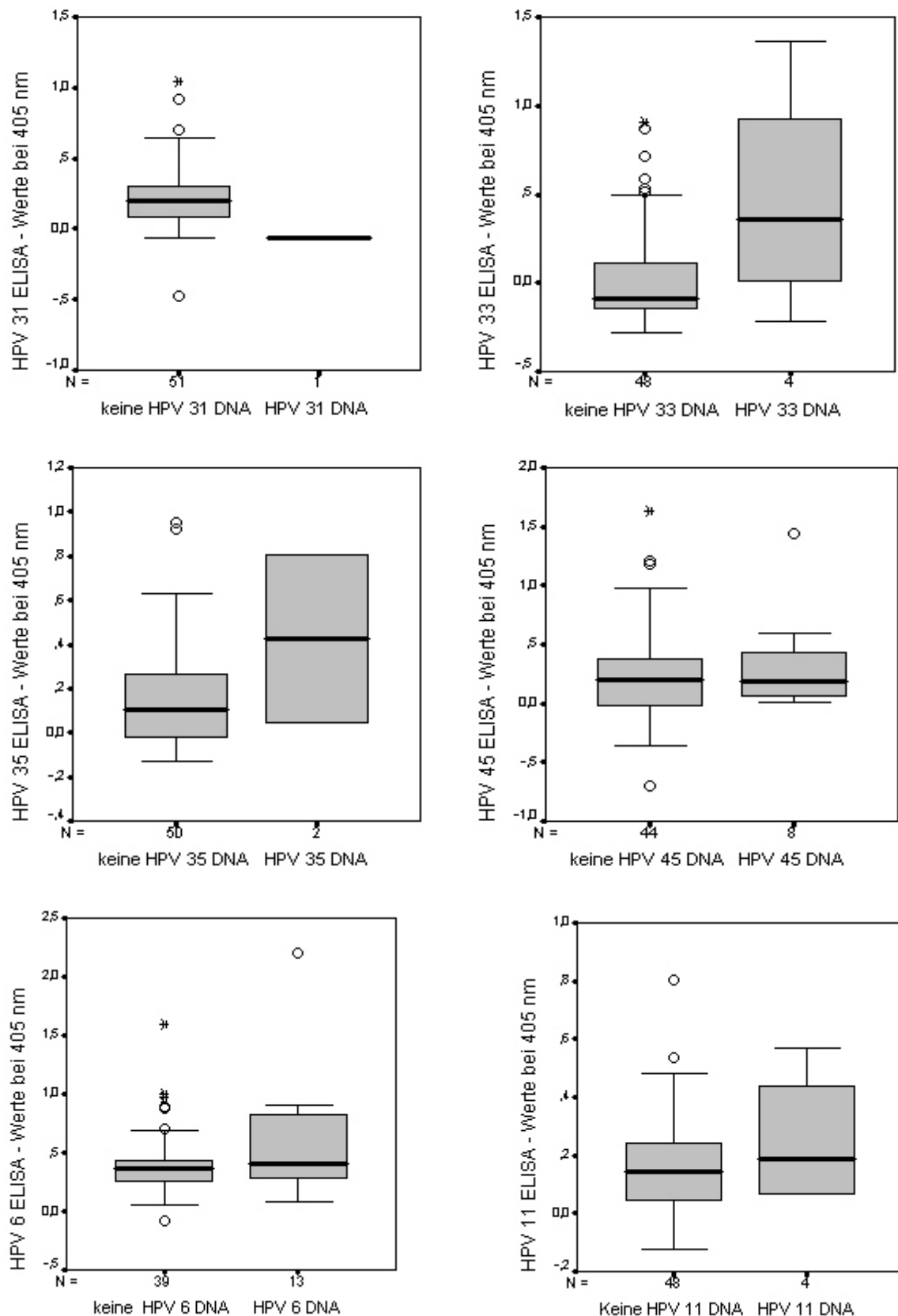


Abbildung 3.2.1.: ELISA -Werte der 52 Patientinnen am Anfang des Beobachtungszeitraumes. Die Frauen wurden dichotom nach Vorkommen von HPV-DNA 16, 18, 31, 33, 35, 45, 6 und 11 jeweils in zwei Gruppen aufgeteilt und an Hand der ELISA-Werte gleichen Genotyps

miteinander verglichen. Darstellung als Boxplot: Abweichungsstriche = minimaler und maximaler Wert; unterer Boxenrand = 25. Perzentile; oberer Boxenrand = 75. Perzentile; Mittellinie = Median. „Ausreißer“ (Extremwerte) sind mit einem Stern bzw. Kreis gekennzeichnet. N = die Anzahl der Patientinnen in einer Gruppe.

In der statistisch Auswertung mit Hilfe des **t-Tests** (für unabhängige Stichproben) zeigten jedoch nur die Mittelwerte der Standardabweichungen von HPV 16 eine tendenzielle ($t = 1,891$; $df = 50$; $p = 0,064$; T-Test) und von HPV 33 eine signifikante Differenz ($t = 2,464$; $df = 50$; $p = 0,017$). Bei den anderen der acht getesteten HPV-Typen konnte kein Zusammenhang zwischen dem Nachweis von HPV-DNA aus dem Zervixabstrich und typenspezifischen Antikörpern im Serum zum gleichen Zeitpunkt festgestellt werden (siehe Tabelle 3.2.1.)

| t-Test für unabhängige Stichproben | HPV 16 | HPV 18 | HPV 31 | HPV 33 | HPV 35 | HPV 45 | HPV 6 | HPV 11 |
|------------------------------------|--------------|--------|--------|--------------|--------|--------|-------|--------|
| Mittelwert der DNA negativen | 0,146 | 0,111 | 0,237 | 0,444 | 0,172 | 0,252 | 0,413 | 0,168 |
| Mittelwert der DNA positiven | 0,389 | 0,140 | 0,061 | 0,466 | 0,424 | 0,353 | 0,606 | 0,253 |
| Prüfgröße (t) | 1,891 | 0,431 | 1,161 | 2,464 | 1,331 | 0,622 | 1,564 | 0,875 |
| Anzahl der Freiheitsgrade (df) | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 |
| Irrtumswahrscheinlichkeit (p) | <u>0,064</u> | 0,669 | 0,251 | <u>0,017</u> | 0,189 | 0,537 | 0,124 | 0,384 |

Tabelle 3.2.1. : Statistischer Zusammenhang (t-Test für unabhängige Stichproben) zwischen den ELISA-Werten (Serumantikörpern) aus den Blutproben und den entsprechenden typenspezifischen HPV-DNA-Nachweisen aus den gleichzeitig entnommenen Zervixabstrichen. Angegeben sind die ELISA-Mittelwerte für DNA positive und negative Patientinnen, sowie die Prüfgröße t, die Anzahl der Freiheitsgrade df und die Irrtumswahrscheinlichkeit p.

Um positive Antikörperreaktionen zu definieren wurden zur Berechnung von Grenzwerten Blutseren präpubertärer Mädchen aus der Pädiatrie herangezogen. Eine Seroreaktion wurde als positiv angesehen, wenn ein ELISA-Wert zwei Standardabweichungen über dem Mittelwert dieser getesteten Seren lag. Die so berechneten Grenzwerte waren für HPV 16 = 0,188; für HPV 18 = 0,139; für HPV 31 = 0,346; für HPV 33 = 0,137; für HPV 35 = 0,163; für HPV 45 = 0,251; für HPV 6 = 0,547 und für HPV 11 = 0,218. Der damit bestimmte dichotome Antikörperstatus (positive oder negative Seroreaktion) wurde genutzt, um wiederum auf einen möglichen Zusammenhang zwischen Serumantikörper-Prävalenz und HPV-DNA-Nachweis

zum gleichen Untersuchungszeitpunkt zu prüfen.

In dem angewendeten Chi-Quadrat-Test, wurde das Ergebnis aus dem oben verwendeten t-Test bestätigt. 21 (61,7%) von 34 HPV-16-DNA-positiven Frauen waren auch im Antikörper-test positiv, verglichen mit nur 4 (22,2%) Positiven unter 18 Frauen ohne nachweisbare HPV-16-DNA ($p < 0,009$ Fishers-Exakt-Test). Für HPV 33 konnte eine starke Tendenz der Abhängigkeit beider Variablen errechnet werden ($p < 0,055$). Zwischen alle anderen untersuchten HPV-Typen konnte jedoch kein statistischer Zusammenhang hergestellt werden. (siehe Tabelle 3.2.2.).

| Kreuztest χ^2 | | HPV 16 | | HPV 18 | | HPV 31 | | HPV 33 | | HPV 35 | | HPV 45 | | HPV 6 | | HPV 11 | |
|---------------------------------------|-------|--------------|------|--------|------|--------|-----|--------------|------|--------|------|--------|------|-------|-----|--------|------|
| | | AK | | AK | | AK | | AK | | AK | | AK | | AK | | AK | |
| | | - | + | - | + | - | + | - | + | - | + | - | + | - | + | - | + |
| DNA neg. | beob. | 14 | 4 | 27 | 15 | 41 | 10 | 37 | 11 | 30 | 20 | 26 | 18 | 31 | 8 | 32 | 16 |
| | erw. | 9,3 | 8,7 | 26,7 | 15,3 | 41,2 | 9,8 | 35,1 | 12,9 | 29,8 | 20,2 | 26,2 | 17,8 | 29,3 | 9,8 | 31,4 | 16,6 |
| DNA pos. | beob. | 13 | 21 | 6 | 4 | 1 | 0 | 1 | 3 | 1 | 1 | 5 | 3 | 8 | 5 | 2 | 2 |
| | erw. | 17,4 | 16,3 | 6,3 | 3,7 | 0,8 | 0,2 | 2,9 | 1,1 | 1,2 | 0,8 | 4,8 | 3,2 | 9,8 | 3,3 | 2,6 | 1,4 |
| 2-seitiger Fishers-Exakt-Test (p) | | <u>0,009</u> | | 1,0 | | 1,0 | | <u>0,055</u> | | 1,0 | | 1,0 | | 0,269 | | 0,602 | |

Tabelle 3.2.2.: Statistischer Zusammenhang zwischen „positiven“ typenspezifischen Sero-reaktionen und den gleichzeitigen Nachweisen von entsprechend typenspezifischen HPV-DNAs im Zervixabstrich. Angewendet wurde der Chi-Quadrat-Test. Sowohl der beobachtete als auch der erwartete Wert sind aufgeführt („Werte die bei einer zufälligen Verteilung erwartet würden“). Das Ergebnis ist als p -Wert im 2-seitigen Fishers-Exakt-Test angegeben.

3.3. Einfluss des Infektionsablaufes und der Dauer des DNA-Nachweises auf die Antikörperbildung

Um herauszufinden, ob die Art des Verlaufs und die Dauer eines DNA Nachweises, einen Einfluss auf die Antikörperreaktion hat, wurden die VLP spezifischen IgG-Reaktionen zum letzten Untersuchungstermin mit den unterschiedlichen Infektionsverläufen (DNA-Nachweismustern) im Beobachtungszeitraum verglichen. Dazu wurde in Gruppen mit persistierender (zu jedem Untersuchungszeitpunkt nachweisbare DNA), fluktuierender (nicht kontinuierlich nachweisbare DNA oder DNA seit 6 bis 18 Monate nachweisbar), und überwundener HPV Infektion (DNA nur am Anfang des Untersuchungszeitraums oder mindestens seit >12 Monate nicht mehr nachweisbar) sowie ohne Infektion (DNA zu keinem Untersuchungszeitpunkt nachweisbar) und Neuinfektion mit HPV (DNA nur in letzter Untersuchung und nicht >6 Monate nachweisbar) eingeteilt.

Wie die Abbildung 3.3.1. zeigt, wurde bei HPV 16, in der Gruppe mit persistierendem DNA-Nachweis, die höchsten VLP spezifischen IgG-Reaktionen, als auch, nach Setzen des oben genannten Grenzwertes, die höchsten positiven Antikörperreaktionen (62%) gemessen. In den Gruppen mit fluktuierender und überwundener Infektion wurden 50% bzw. 40% Antikörperreaktionen beobachtet. Die Unterschiede dieser Gruppen zu der mit persistierender DNA sind mit $p = 0,400$ beziehungsweise $p = 0,353$ (Mann-Whitney-Test) allerdings nicht signifikant. Eine deutliche signifikante Varianz zeigt jedoch der Vergleich persistierender DNA mit der Gruppe der Neuinfektionen (Mann-Whitney-Test, $p = 0,009$). Da nur eine Patientin im Beobachtungszeitraum keinen Nachweis von HPV-16-DNA zeigte, kann für diese Gruppe keine aussagekräftige Statistik errechnet werden. Allerdings liegt dieser einzelne Wert deutlich unter den Werten mit DNA-Nachweis im Verlauf.

Zur Vollständigkeit wurde im unteren Teil der Abbildung 3.3.1. die Gruppe der Patienten mit DNA 16-Nachweis im Verlauf, der Gruppe mit Neuinfektion und ohne Infektion gegenübergestellt. Auch hier konnten signifikant höhere Werte, in der Gruppe mit mindestens einmaligem Infektionsnachweis im Untersuchungszeitraum, gegenüber den Neuinfektionen gezeigt werden ($p = 0,023$, Mann-Whitney-Test).

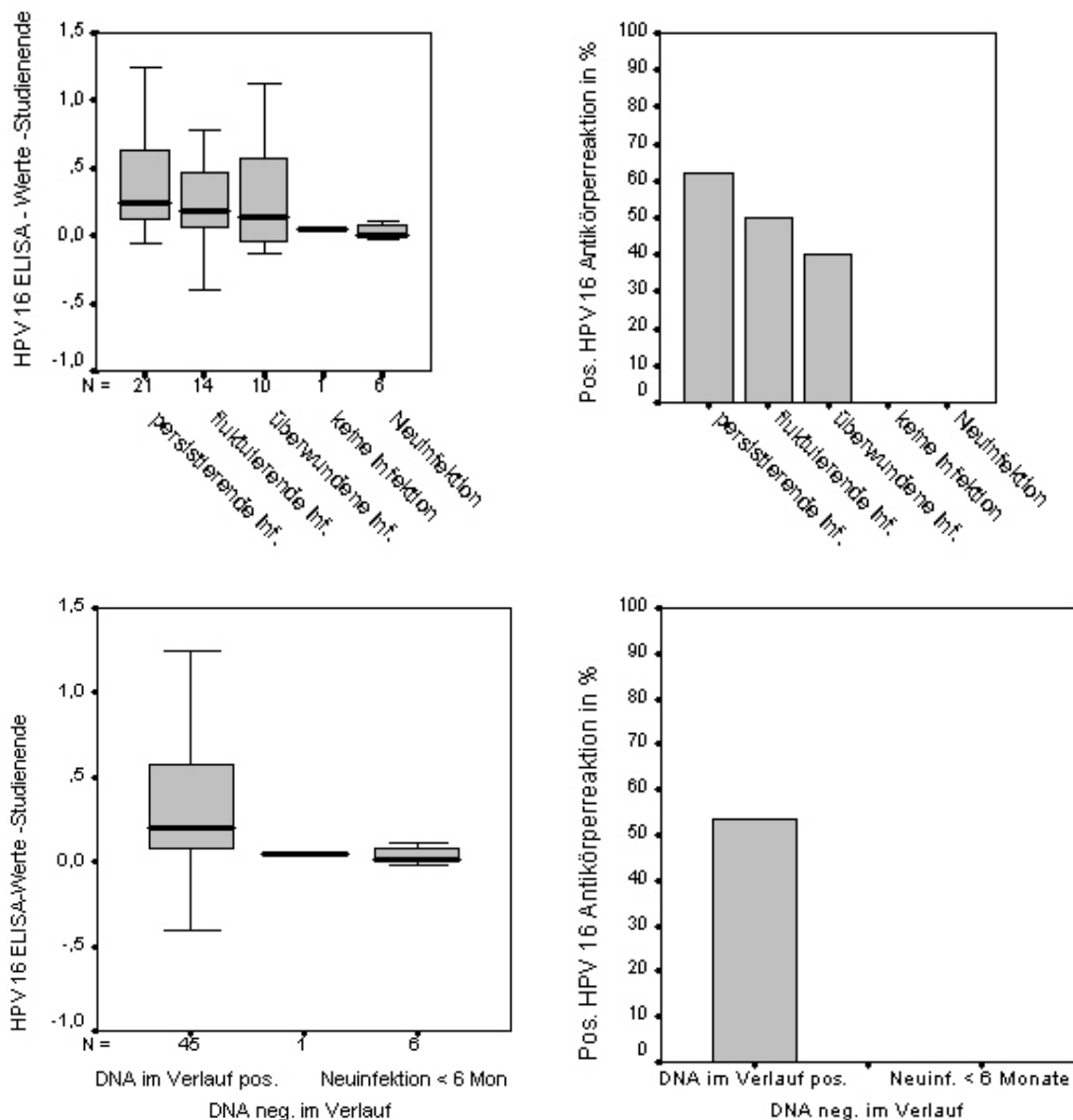


Abbildung 3.3.1.: IgG-Reaktivität gegen HPV 16 virus-like particles (VLPs), zum Zeitpunkt des letzten Besuchs in Abhängigkeit der HPV-16-DNA-Verläufe im Beobachtungszeitraum. Links jeweils: ELISA-Werte in Boxplotdarstellung (Erklärung siehe oben). Rechts jeweils: Darstellung der positiven Antikörperreaktionen als Balkendiagramm, nach Setzen des Grenzwertes (0,188). N gibt die Anzahl der Patientinnen in einer Gruppe an.

Auch bei HPV 18 zeigte die Gruppe mit persistierender HPV-18-DNA die höchsten ELISA-Werte für HPV 18. Allerdings waren die ELISA-Ergebnisse der Frauen mit fluktuierendem DNA-Nachweis deutlich niedriger, als bei denen die ihre Infektion überwunden hatten. Sie zeigten somit einen gegensätzlichen Verlauf wie bei HPV 16. Eine starke Tendenz zur Varianz ergab der Vergleich der Patientinnen, die mindestens einmal im Untersuchungszeitraum DNA 18 positiv getestet wurden und den Patienten ohne Nachweis von DNA 18 im

Verlauf ($p = 0,077$). Nur eine Patientin zeigte eine Neuinfektion mit HPV 18, in den letzten sechs Monaten. Dieser ELISA-Wert war ähnlich niedrig, wie der, der HPV-18-DNA negativen Patienten und lag ebenfalls unterhalb des Grenzwertes. (siehe Abbildung 3.3.2.)

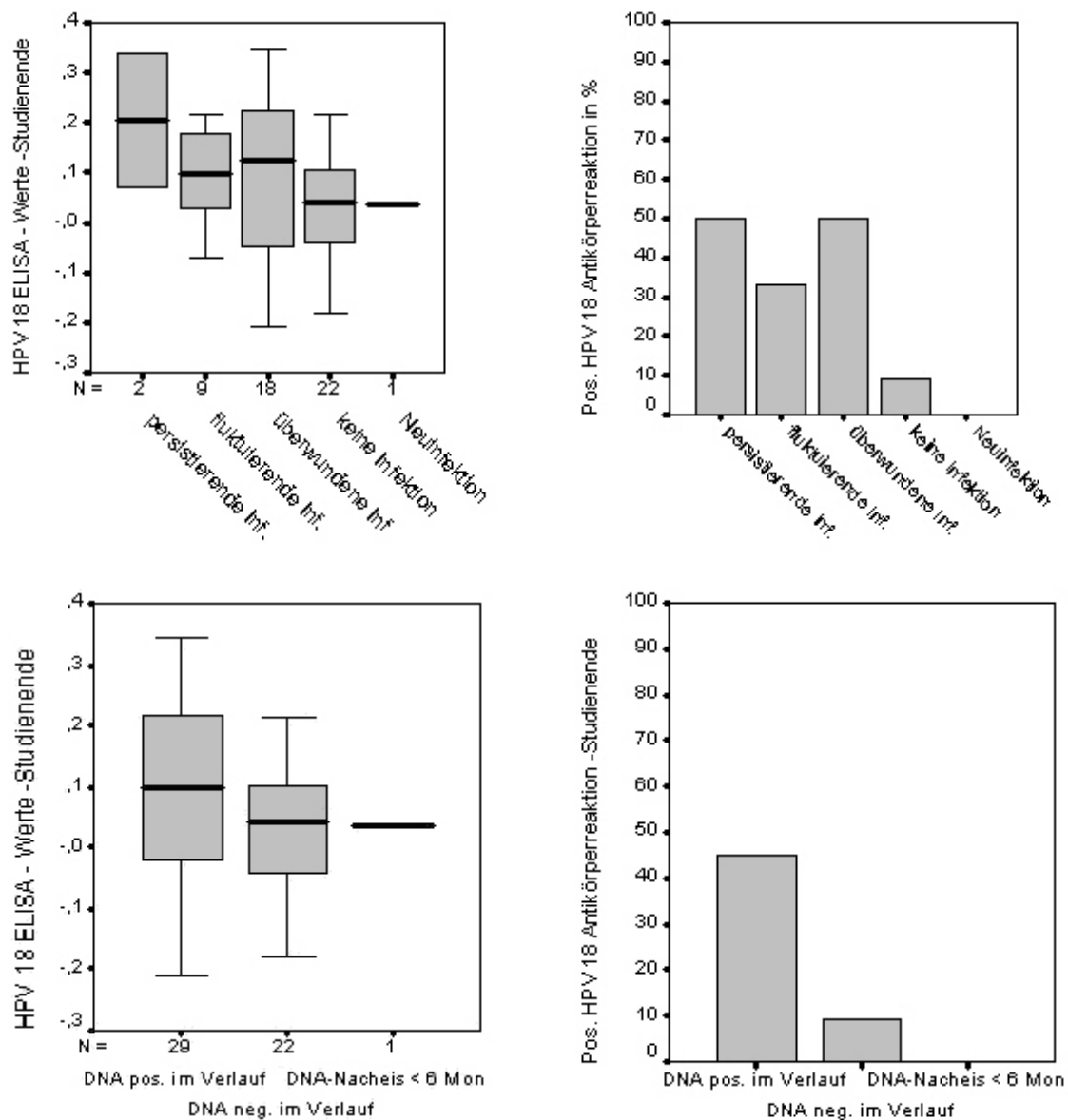


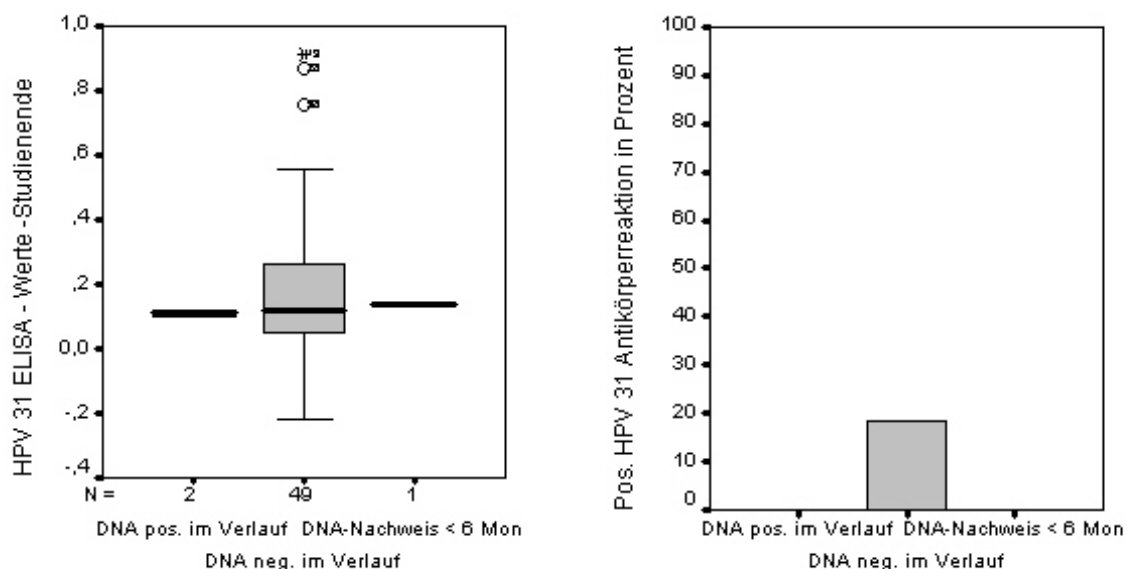
Abbildung 3.3.2.: IgG-Reaktivität gegen HPV 18 virus-like Particles (VLPs), zum Zeitpunkt des letzten Besuchs in Abhängigkeit der HPV-18-DNA-Verläufen im Beobachtungszeitraum. Links jeweils: ELISA-Werte in Boxplotdarstellung (Erklärung siehe oben). Rechts jeweils: Darstellung der positiven Antikörperreaktionen als Balkendiagramm, nach Setzen des Grenzwertes (0,139). N gibt die Anzahl der Patientinnen in einer Gruppe an.

Bei HPV 31, 33, 35 waren die Fallzahlen der einzelnen Gruppen, wegen der insgesamt geringeren Prävalenz, für die oben genannte Einteilung zu klein. Daher konnte hier nur, die Gruppe mit mindestens einmalig nachweisbarer HPV-DNA im Beobachtungszeitraum, der Gruppe ohne Infektionsnachweis und der mit Neuinfektionen in den letzten sechs Monaten gegenübergestellt werden. (siehe Abbildung 3.3.3.)

Insgesamt waren bei HPV 33 und 35 ähnliche Tendenzen zu beobachten, wie bei HPV 16 und 18. 33% (50%) der im Verlauf HPV-33-DNA (35) positiven Patientinnen hatten am Ende des Untersuchungszeitraums positive Antikörperreaktionen, im Vergleich zu 23% (31%) derer ohne DNA Nachweis. Im Mann-Whitney-Test zeigte sich mit $p = 0,402$ ($p = 0,884$) jedoch nur eine geringe Varianz dieser ELISA-Werte. In den Gruppen der Neuinfektionen konnten, in beiden Fällen, keine Antikörper nachgewiesen werden.

Bei den einzigen zwei Patientinnen, die HPV-31-DNA positiv waren, wurden keine Antikörperreaktionen nachgewiesen. Dem entgegen konnten in der DNA-31 negativen Gruppe 18% positive Seroreaktionen festgestellt werden (siehe Abbildung 3.3.3.).

Auffällig war, dass bei allen drei HPV-Typen, in den Gruppen mit Neuinfektionen, keine entsprechenden Antikörper nachgewiesen wurden.



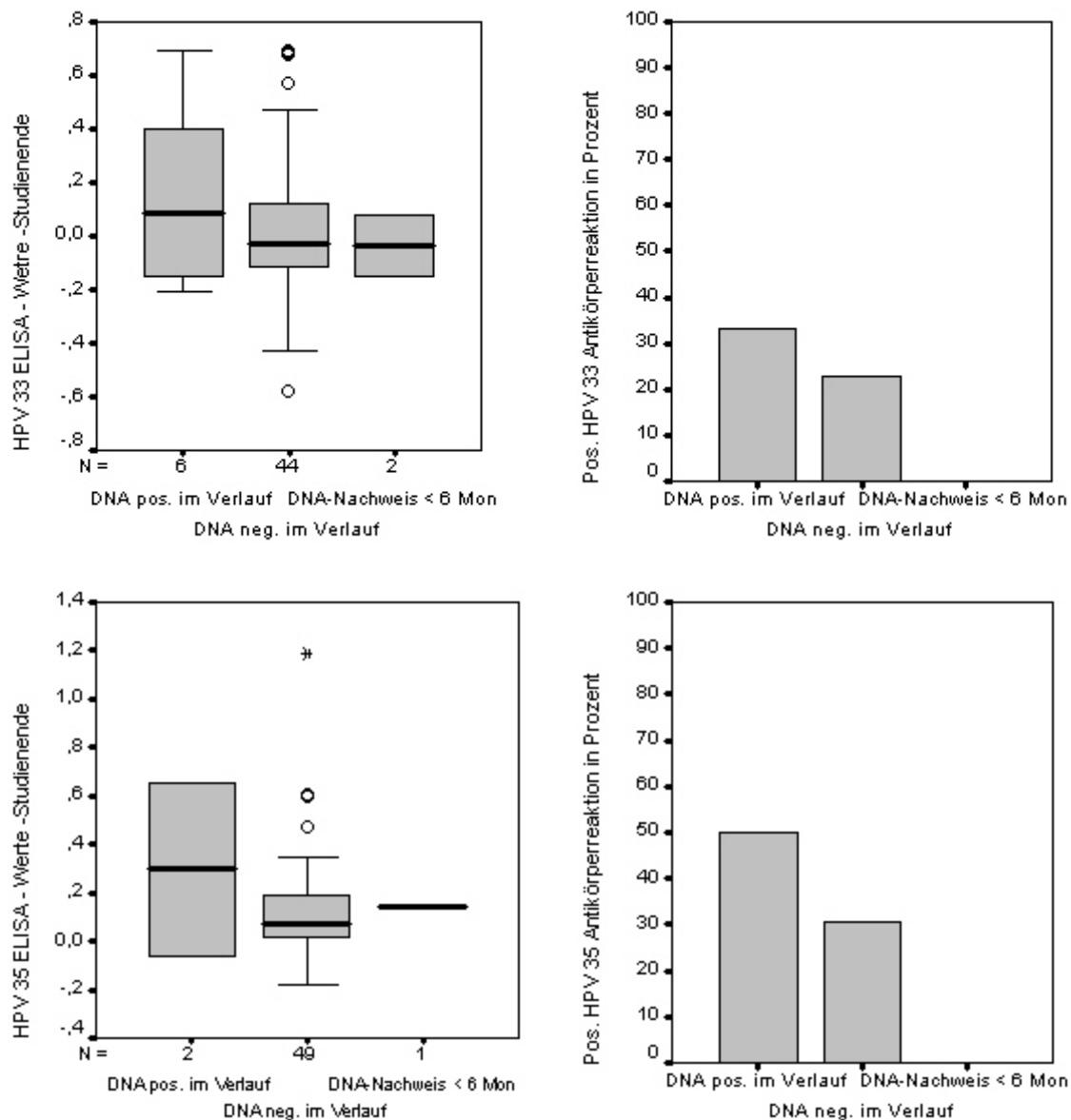


Abbildung 3.3.3. : IgG-Reaktivität gegen HPV 31, 33, 35, virus-like particles (VLPs), zum Zeitpunkt des letzten Besuchs in Abhängigkeit der HPV 31, 33, 35 DNA-Verläufe im Beobachtungszeitraum. Links jeweils: ELISA-Werte in Boxplotdarstellung (Erklärung siehe oben). Rechts jeweils: Darstellung der positiven Antikörperreaktionen als Balkendiagramm, nach Setzen der Grenzwerte (0,346; 0,137 und 0,163). N gibt die Anzahl der Patientinnen in einer Gruppe an.

Bei HPV 45 konnten in den Gruppen fluktuierende Infektion, überwundene Infektion und keine Infektion, am Ende etwa gleiche positive Antikörperreaktionen festgestellt werden (33-38%). Lediglich die persistierende Gruppe zeigte höhere ELISA-Werte, als die DNA-negative. Der Unterschied war jedoch nicht signifikant ($p = 0,252$). Wie bereits bei den anderen HPV-Typen, zeigte auch hier die einzige Patientin mit einer HPV-45-Neuinfektion, einen Wert weit unterhalb des Grenzwertes.

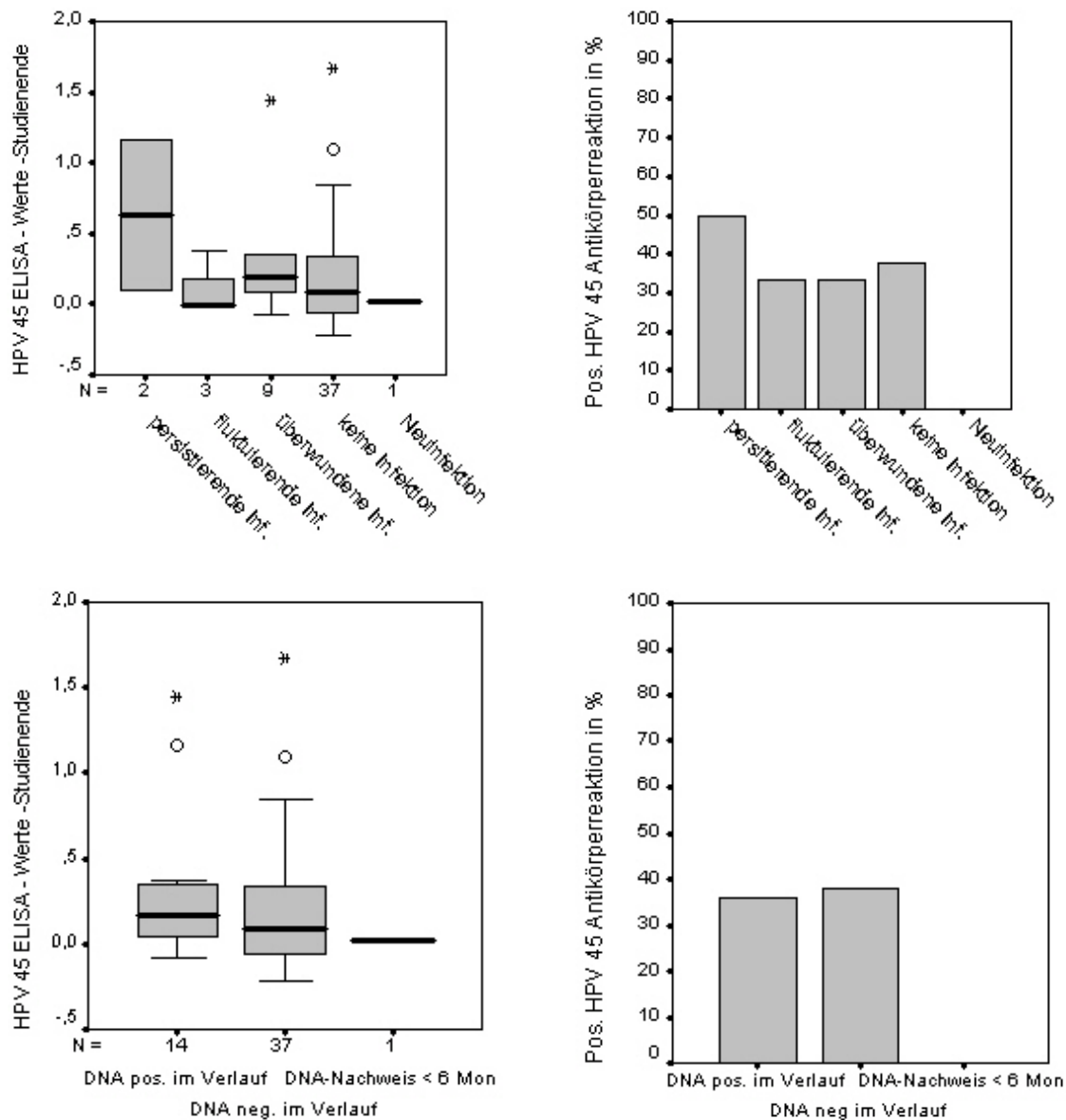


Abbildung 3.3.4. : IgG-Reaktivität gegen HPV 45 virus-like particles (VLPs), zum Zeitpunkt des letzten Besuchs in Abhängigkeit der HPV-45-DNA-Verläufen im Beobachtungszeitraum. Links jeweils: ELISA-Werte in Boxplotdarstellung (Erklärung siehe oben). Rechts jeweils: Darstellung der positiven Antikörperreaktionen als Balkendiagramm, nach Setzen des Grenzwertes (0,251). N gibt die Anzahl der Patientinnen in einer Gruppe an.

Bei HPV 6 lies sich keine deutliche Tendenz der ELISA-Werte zwischen den einzelnen Gruppen erkennen. Die Patienten, mit HPV-6-DNA-Nachweis im Verlauf, hatten sogar mit 27% positiven Antikörperreaktionen niedrigere Werte als die DNA-Negativen, mit 36%. Auffällig ist allerdings, dass alle drei extrem hohen ELISA-Werte (mit Kreis und Stern gekennzeichnet) Patientinnen entsprechen, bei denen als einzige Kondylome makroskopisch sichtbar waren und behandelt wurden. (siehe Abbildung 3.3.5.)

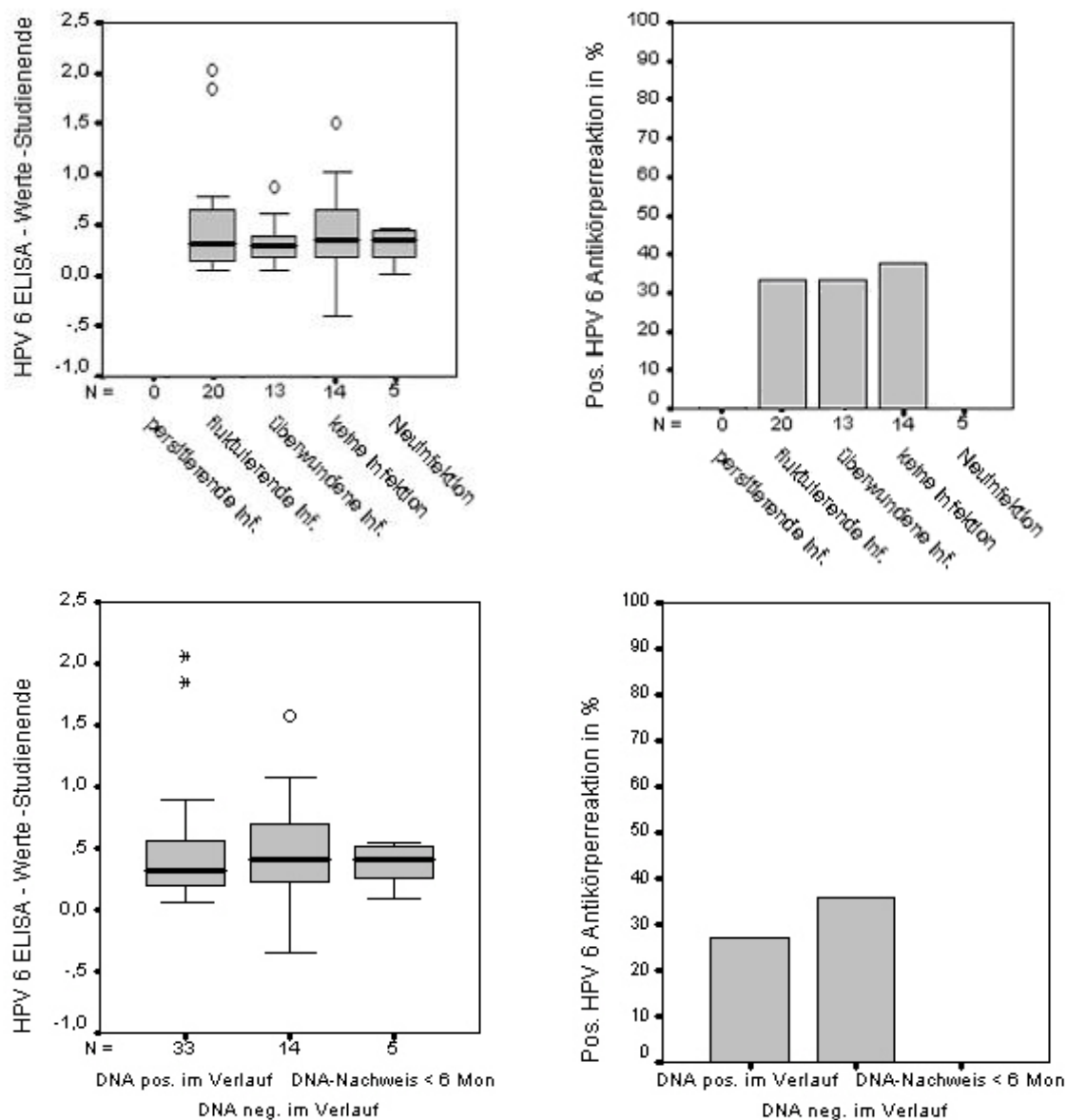


Abbildung 3.3.5. : IgG-Reaktivität gegen HPV 6 virus-like particles (VLPs), zum Zeitpunkt des letzten Besuchs in Abhängigkeit der HPV-6-DNA-Verläufen im Beobachtungszeitraum. Links jeweils: ELISA-Werte in Boxplotdarstellung (Erklärung siehe oben). Rechts jeweils: Darstellung der positiven Antikörperreaktionen als Balkendiagramm, nach Setzen des Grenzwertes (0,547). N gibt die Anzahl der Patientinnen in einer Gruppe an.

Wie aus der Abbildung 3.3.6. ersichtlich wird, stellten sich bei HPV 11, bei allen Verlaufsgruppen, etwa gleiche Antikörperreaktionen um die 30 % ein. Nur der fluktuierende DNA-Nachweis zeigt, mit 14 % positiver Reaktionen, einen niedrigeren Wert. Im Vergleich der ELISA-Werte von Patientinnen mit DNA- bzw. ohne DNA-Nachweis im Verlauf, zeigte sich sogar eine Tendenz zum negativen Zusammenhang ($p = 0,162$). Allerdings egalisierte sich dieses Ergebnis nach Setzen des Grenzwertes. (siehe Abbildung 3.3.6.)

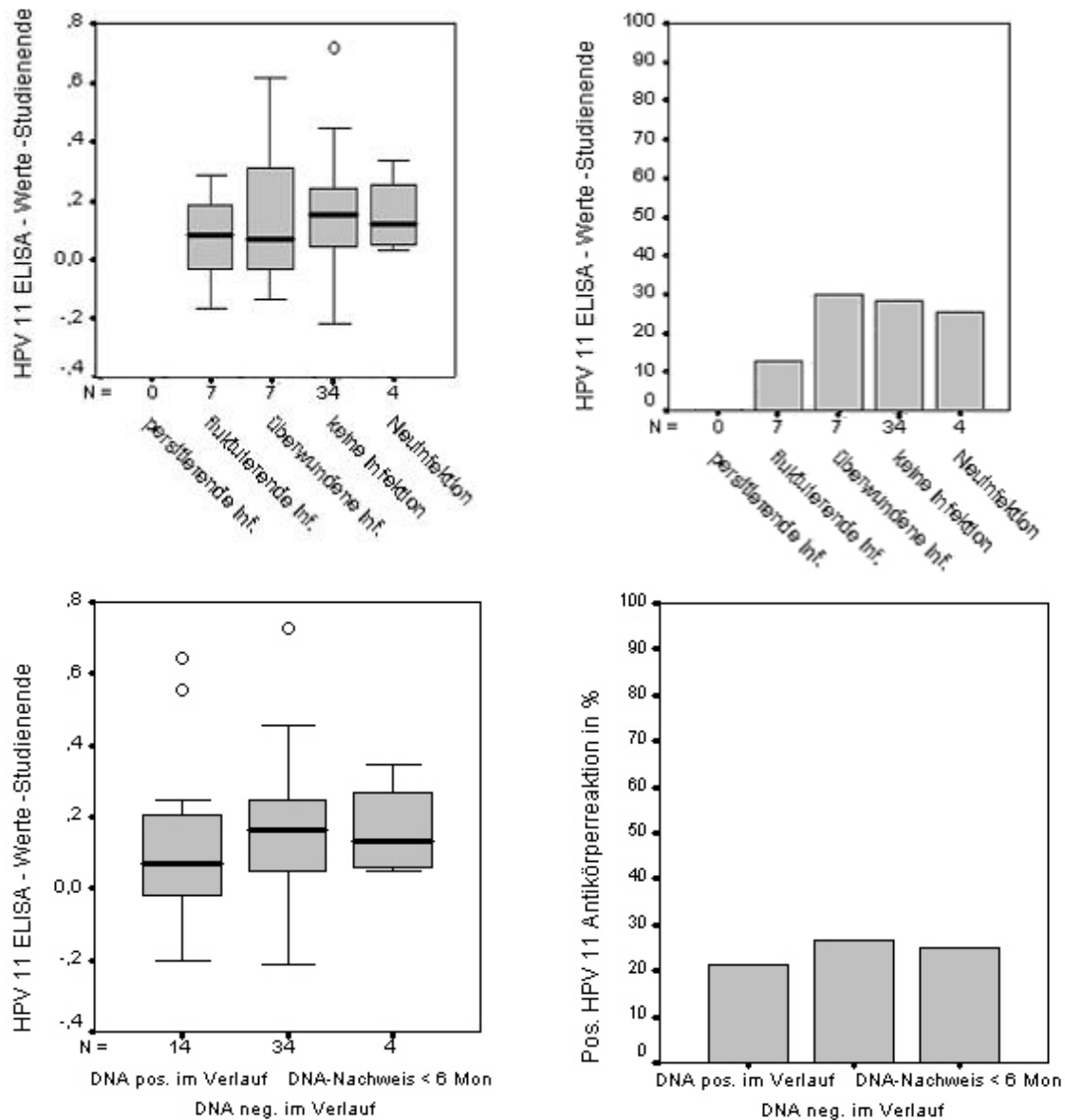


Abbildung 3.3.6. : IgG-Reaktivität gegen HPV 11 virus-like particles (VLPs), zum Zeitpunkt des letzten Besuchs in Abhängigkeit der HPV-11-DNA-Verläufe im Beobachtungszeitraum. Links jeweils: ELISA-Werte in Boxplotdarstellung (Erklärung siehe oben). Rechts jeweils: Darstellung der positiven Antikörperreaktionen als Balkendiagramm, nach Setzen des Grenzwertes (0,218). N gibt die Anzahl der Patientinnen in einer Gruppe an.

3.4. Einfluss chirurgischer Interventionen am Cervix uteri auf die Antikörperentwicklung und den DNA-Status

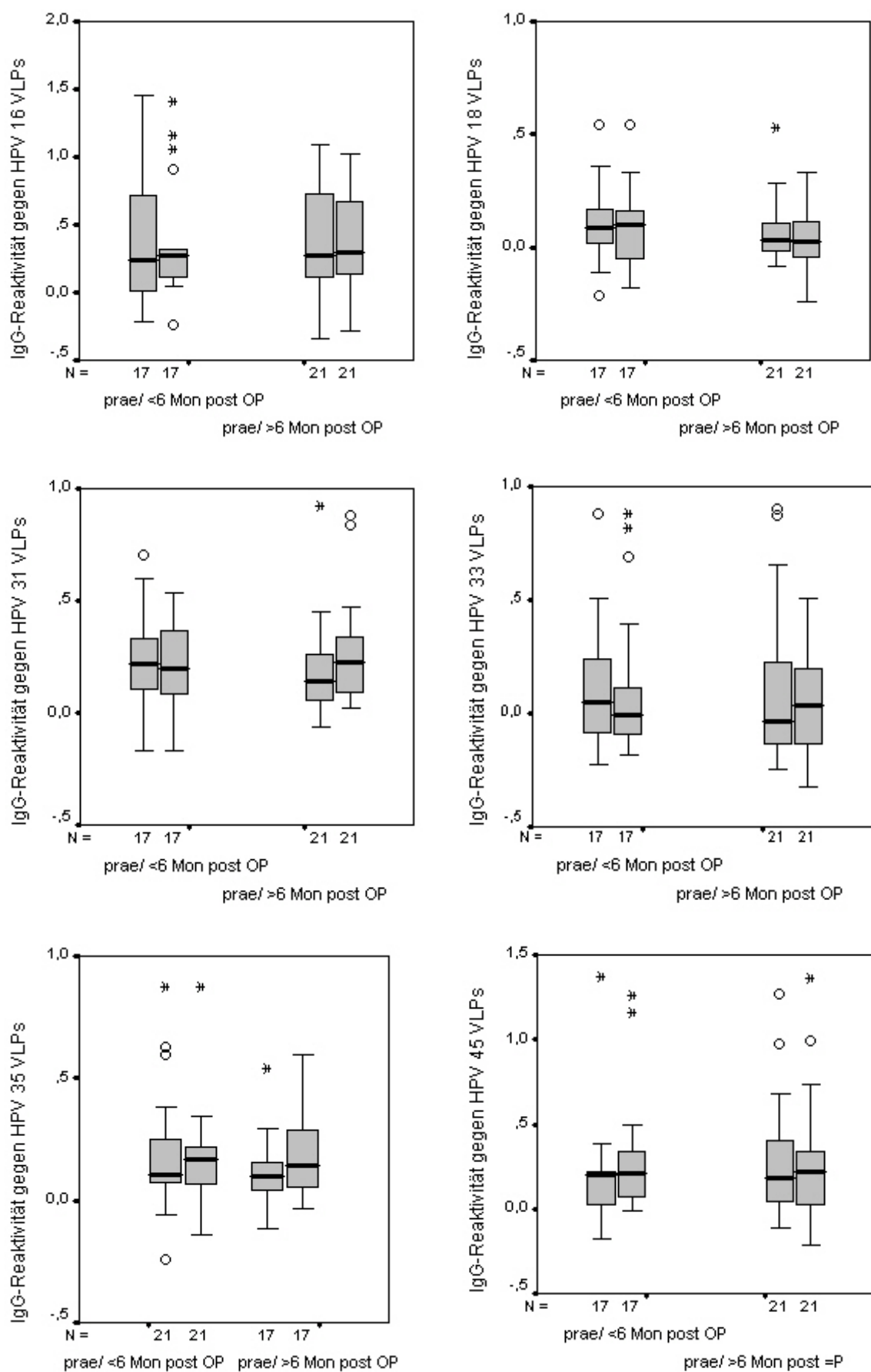
3.4.1. Allgemeine Veränderungen der Antikörperreaktionen prae- und postoperativ

In diesem Abschnitt wurde untersucht, ob chirurgische Interventionen wie Laserevaporationen, Portioabrasionen mit Zervixkürettage, Probebiopsien oder Konisationen einen Einfluss auf die Antikörperentwicklung haben. Dazu wurden die ELISA-Werte, eingeteilt nach HPV-Genotypen, sowohl vor als auch nach einem operativen Eingriff gemessen. Einer eventuellen Zeitverzögerung im Anstieg oder Abfall der Antikörpertiter wurde durch Unterteilung in zwei Gruppen Rechnung getragen. Ein Teil der Patientinnen wurden innerhalb von sechs Monaten und der andere Teil erst später als sechs Monate postoperativ untersucht. Zur statistischen Auswertung wurden der Wilcoxon-, 2-seitige-exakt Test (Vergleich der ELISA-Werte vor und nach OP) und der Mc Nemar-, 2-seitige-exakt-Test (Vergleich der positiven Antikörperreaktionen vor und nach OP) angewendet.

Wie in Abbildung 3.4.1. dargestellt, waren bei den Patientinnen, die **innerhalb von sechs Monaten** nach dem Eingriff untersucht wurden nur sehr leichte und uneinheitliche Änderungen der ELISA-Werte festzustellen. Während die Mediane der HPV-Typen 16, 18, 35, 45 und 11 anstiegen, fielen 31, 33 und 6 ab. Nur für HPV 35 und 45 konnten dabei leicht signifikante, beziehungsweise tendenzielle Änderungen nach oben berechnet werden ($p(35) = 0,049$; $p(45) = 0,056$; Wilcoxon-, 2-seitiger-exakt Test).

Wurden allerdings nur dichotome Änderungen betrachtet, also Serokonversionen beziehungsweise Abfälle der Antikörpertiter unter den Grenzwert, so ließen sich für keinen der HPV-Typen signifikante Varianzen zeigen (siehe Tabelle 3.4.1.).

Bei den Patientinnen die erst **später als sechs Monate** nach dem Eingriff untersucht wurden, stiegen alle Mediane bis auf HPV 18 leicht an. Jedoch konnten hier sowohl für die relativen als auch für die dichotomen Änderungen keine signifikanten Unterschiede prae- und postoperativ berechnet werden (siehe Tabelle 3.4.1.).



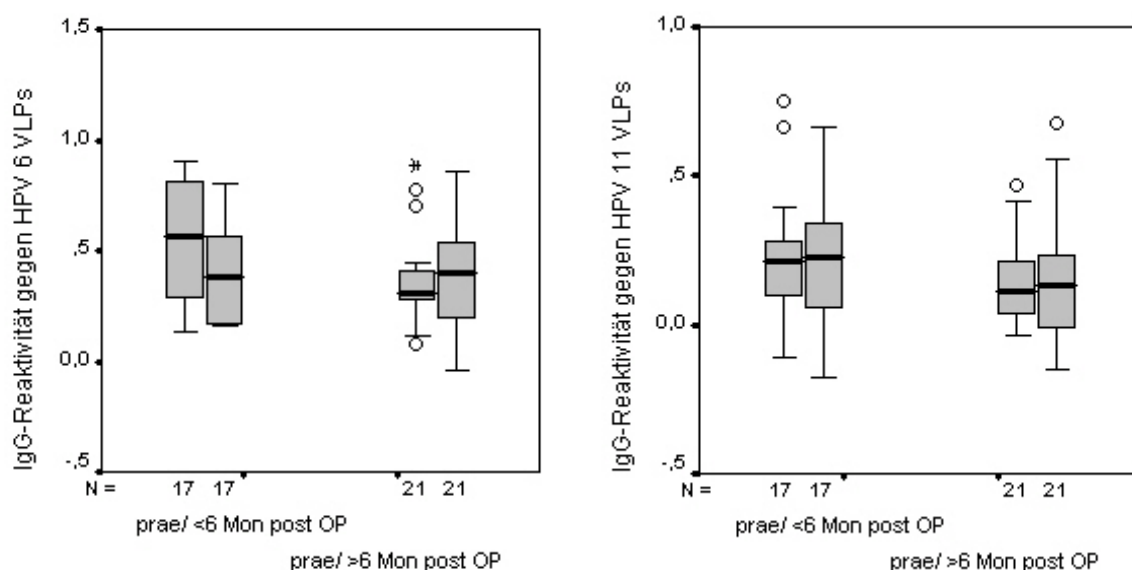


Abb. 3.4.1 : Änderungen der IgG-Reaktivität nach einem operativen Eingriff. Dargestellt sind die ELISA-Werte vor und nach einer Intervention in Boxblotdarstellung (siehe oben). Jede Grafik entspricht einem spezifischen HPV-Typen. Links ist jeweils die Gruppe mit Untersuchung innerhalb sechs Monaten und rechts die Gruppe mit Untersuchung später als sechs Monate post operativ dargestellt. N gibt die Anzahl der Patientinnen in einer Gruppe an.

| | Wilcoxon-Test der IgG-Reaktivität prae- und post OP. 2-seitiger-exakt-Test | | Anzahl positiver AK-Reaktionen prae- und < 6 Mon. post OP. n = 17 | | Anzahl positiver AK-Reaktionen prae- und > 6 Mon. post OP. n = 21 | | Mc Nemar-Test Positiver AK-Reaktionen prae- und post OP. 2-seitiger-exakt-Test | |
|--------|--|---------------|---|-----------------|---|-----------------|--|---------------|
| | <6 Mon. n = 17 | >6 Mon n = 21 | prae OP | <6 Mon. post OP | prae OP | <6 Mon. post OP | <6 Mon. n = 17 | >6 Mon n = 21 |
| HPV 16 | 1,000 | 0,852 | 10 | 11 | 12 | 14 | 1,000 | 0,625 |
| HPV 18 | 1,000 | 0,852 | 6 | 5 | 4 | 5 | 1,000 | 1,000 |
| HPV 31 | 0,121 | 0,525 | 4 | 5 | 3 | 3 | 1,000 | 1,000 |
| HPV 33 | 0,796 | 0,275 | 6 | 4 | 8 | 8 | 0,500 | 1,000 |
| HPV 35 | 0,049 | 0,881 | 4 | 7 | 8 | 11 | 0,453 | 0,453 |
| HPV 45 | 0,056 | 0,575 | 4 | 7 | 9 | 9 | 0,375 | 1,000 |
| HPV 6 | 0,234 | 0,433 | 9 | 5 | 3 | 5 | 0,127 | 0,500 |
| HPV 11 | 0,679 | 0,709 | 7 | 9 | 5 | 7 | 0,625 | 0,688 |

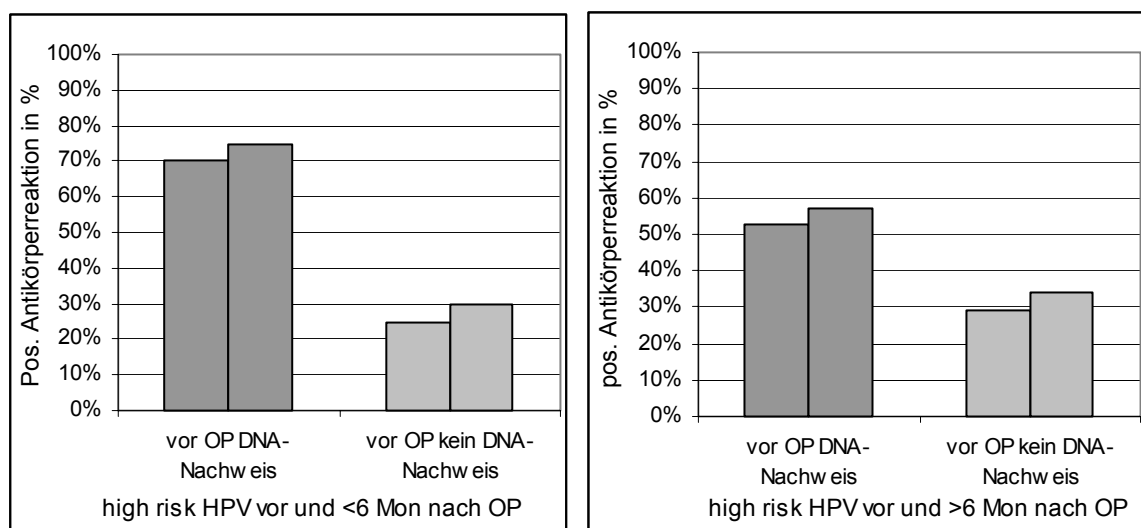
Tabelle 3.4.1.: Varianzberechnung der IgG-Reaktivität gegenüber HPV-VLPs prae- und post operativ für Patientinnen, die innerhalb sechs und später als sechs Monate nach einem Eingriff untersucht wurden. Für „relative“ Änderungen wurde der Wilcoxon-Test, für dichotome Änderungen der Mc Nemar-Test angewendet.

3.4.2. Einfluss chirurgischer Interventionen an der Cervix uteri auf die Antikörperentwicklung in Abhängigkeit vom praeoperativen HPV-DNA-Status

Im zweiten Abschnitt sollte geprüft werden, ob durch chirurgische Intervention bei HPV-Infizierten und dem damit verbundenen Kontakt von Virus-DNA mit der Blutbahn der Patienten eine Antikörperbildung begünstigt wird oder die Antikörper infolge der sinkenden Viruslast eventuell abfallen.

Dazu wurden die Änderungen der Antikörperreaktionen von Patientinnen mit nachweisbarer „high-risk“ bzw. „low-risk“ Infektion vor der Operation mit denen ohne Nachweis praeoperativ verglichen. Um auch hier eine eventuell verzögerte Reaktionen zu berücksichtigen, wurde wiederum zwischen Patienten unterschieden, die innerhalb von sechs Monaten und die später als sechs Monate nach dem Eingriff untersucht wurden.

Aus der Abbildung 3.4.2. wird ersichtlich, dass der Prozentsatz der positiven Antikörperreaktionen sowohl bei den Patientinnen mit DNA-Nachweis als auch bei denen ohne Nachweis nach dem Eingriff leicht anstieg. Nur bei Patientinnen mit „low-risk“ HPV-DNA-Nachweis vor dem Eingriff wurde in der Gruppe mit Nachuntersuchung innerhalb sechs Monaten postoperativ ein Abfall der Seroreaktionen beobachtet. Allerdings waren alle Änderungen der Antikörperreaktionen nach einer Operation nicht signifikant (Mc Nemar-Test - siehe Tabelle 3.4.2.).



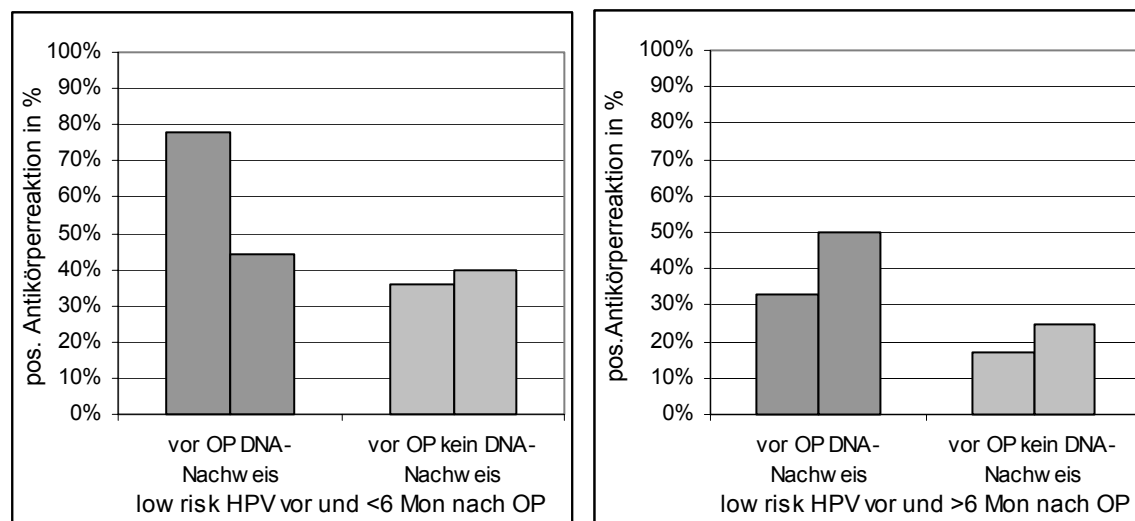


Abb. 3.4.2. : Änderungen positiver Antikörperreaktionen nach einem chirurgischen Eingriff.
Dargestellt sind die prae- und postoperativen positiven Seroreaktionen (< und > sechs Monate), bei Patientinnen mit und ohne Nachweis von high-risk (low-risk) HPV-DNA im praeoperativen Zervixabstrich.

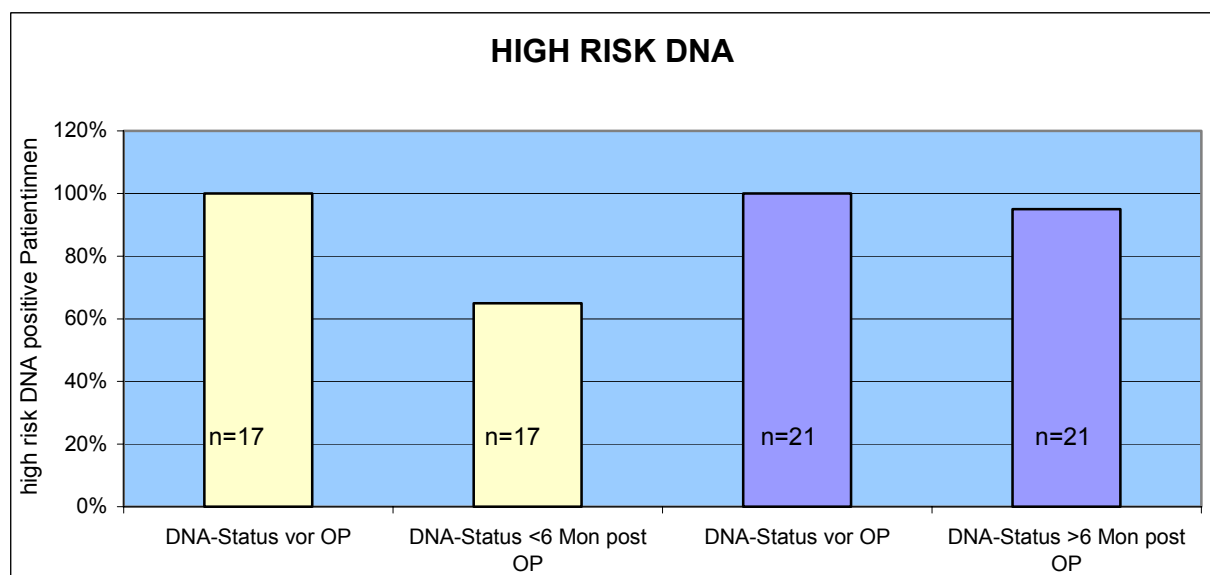
| | Mc Nemar-Test für pos. AK-Reaktionen prae- und < 6 Mon. post OP. | | Mc Nemar-Test für pos. AK-Reaktionen prae- und > 6 Mon. post OP. | |
|--|--|----------------------------|--|-----------------------------|
| | vor OP DNA Nachweis | vor OP keinen DNA-Nachweis | vor OP DNA Nachweis | vor OP keinen DNA -Nachweis |
| high risk HPV (16, 18, 31, 33, 35, 45) | 1,000 | 0,424 | 1,000 | 0,359 |
| low risk HPV (6, 11) | 0,250 | 1,000 | 1,000 | 0,453 |

Tabelle. 3.4.2. : Statistische Auswertung (Mc Nemar-Test) der Änderungen positiver Antikörperreaktionen postoperativ (< und > sechs Monate), bei Patientinnen mit und ohne Nachweis von high-risk (low-risk) HPV-DNA im praeoperativen Zervixabstrich.

3.4.3. Vergleich der DNA-Nachweise prae- und postoperativ

Bei dieser Untersuchung sollte getestet werden, ob eine HPV-Infektion am Zervix durch einen chirurgischen Eingriff entfernt, eine Reinfektion verhindert und so ein Einfluss auf die Infektion ausübt werden kann.

Tabelle 3.4.3. zeigt die Veränderung von high- und low-risk HPV-DNA-Nachweisen aus den Abstrichproben, innerhalb und später als sechs Monate nach operativen Eingriffen an der Cervix uteri. In der Gruppe, die innerhalb von sechs Monaten postoperativ untersucht wurde erfolgte eine signifikante Reduktion der high-risk DNA von 100% auf 65 % ($p=0,031$, Mc Nemar-Test, 2-seitiger Exakt-Test). Während bei den Patientinnen, die erst später getestet wurden, die high-risk DNAs bei fast allen wieder nachweisbar waren (95%, $p=1,000$). Ähnlich verhielt es sich mit dem Nachweis von low-risk HPV-DNA. Auch hier nahm die DNA innerhalb sechs Monate tendenziell von 59% auf 29% ($p=0,125$) ab, während sie in der Gruppe mit Nachuntersuchung später als sechs Monate signifikant von 33% auf 66% zunahm ($p=0,016$).



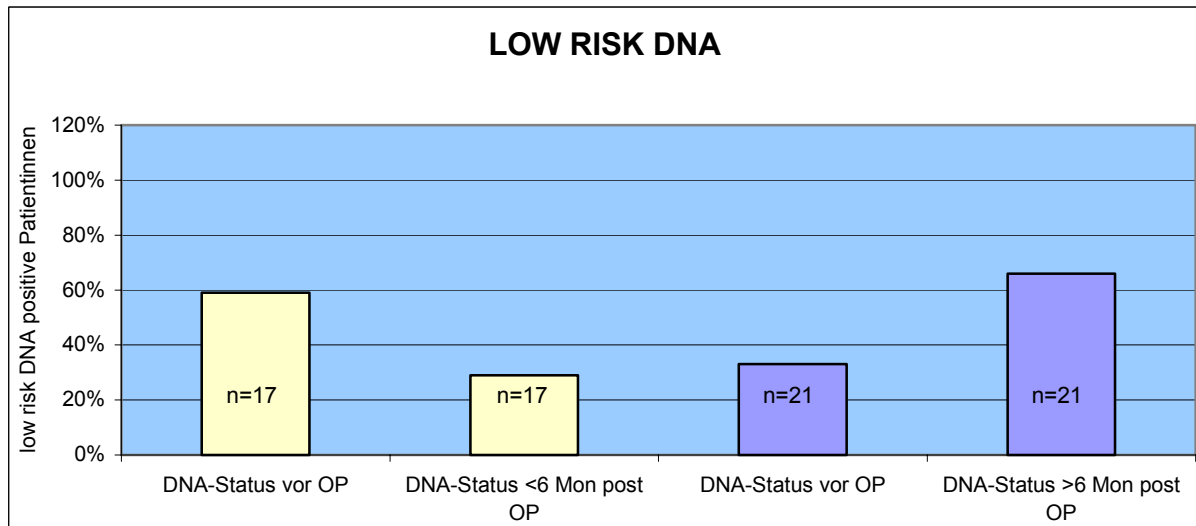


Abbildung 3.4.3.: Veränderung von high- und low-risk DNA-Nachweisen post operativ. Dargestellt sind die positiven Nachweise bei Patientinnen, die innerhalb sechs Monaten (n=17) und später als sechs Monate nach einer chirurgischen Intervention untersucht wurden (n=21). N gibt die Anzahl der Patientinnen in einer Gruppe an.

3.5. HPV-DNA- und Antikörpernachweise im Vergleich zum histologischen Status

3.5.1.1. Einmalige HPV-Antikörpernachweise im Vergleich zur Histologie

In diesem Abschnitt sollte zunächst der Nachweis von spezifischen HPV-Antikörpern im Serum auf den Nutzen als prädiktiver Marker für die Entwicklung schwerer zervikaler Dysplasien getestet werden. Dazu wurde das jeweils schlechteste histologische Ergebnis jeder Patientin während des Beobachtungszeitraums mit dem zu Beginn gemessenen Antikörperreaktionen verglichen. Zur statistischen Auswertung wurde der Chi-Quadrat-Test angewendet und das Ergebnis als p -Wert im 2-seitigen Fishers Exakt-Test angegeben. Zusätzlich wurde die Odds Ratio (OR) bestimmt.

Von 45 Patientinnen, bei denen mindestens ein high-risk HPV-Antikörpertyp in der Erstuntersuchung serologisch nachgewiesen werden konnte, entwickelten 35 eine schwere Dysplasie (CIN II/III, CIS oder CA). Nur zehn entwickelten lediglich eine leichte Dysplasie (CIN I oder benigner). 6 Frauen hatten keine nachweisbaren high-risk HPV-Antikörper, von denen später 4 CIN I oder besser und 2 CIN II oder CIN III aufwiesen. Die daraus errechnete Wahrscheinlichkeit eine schwere Dysplasie zu entwickeln, wenn vorher mindestens ein high-risk Antikörpertyp nachweisbar war, ist mit $p = 0,041$ (2-seitiger Fishers Exakt Test) signifikant (OR 7,0).

Beim Vergleich der einzelnen HPV-Antikörpertypen mit dem histologischen Ergebnis waren die HPV-16-Antikörper am stärksten mit einer schweren Dysplasie ($p = 0,009$; OR=8,07 verbunden. Bei HPV 18 ließ sich eine Tendenz zur Abhängigkeit der Variablen herstellen ($p=0,095$; OR=4,68). Für die anderen HPV-Antikörpertypen konnten keine signifikanten Zuordnungen erfolgen. (siehe Tabellen 3.5.1.1.)

| Kreuztest χ^2 | | HPV 16 AK | | HPV 18 AK | | HPV 31 AK | | HPV 33 AK | | HPV 35 AK | |
|--------------------------------------|-------|-----------|------|-----------|------|-----------|-----|-----------|-----|-----------|------|
| | | - | + | - | + | - | + | - | + | - | + |
| CIN I oder keine Dysplasie | beob. | 11 | 2 | 11 | 2 | 11 | 2 | 7 | 6 | 8 | 5 |
| | erw. | 6,8 | 6,2 | 8,1 | 4,9 | 10,4 | 2,6 | 7,8 | 5,2 | 9,6 | 3,4 |
| CIN II /III CIS oder CA | beob. | 15 | 22 | 20 | 17 | 29 | 8 | 26 | 11 | 23 | 14 |
| | erw. | 19,2 | 17,8 | 22,9 | 14,1 | 29,6 | 7,4 | 27,4 | 9,6 | 22,2 | 14,8 |
| 2-seitiger Fishers Exact-Test (p) | | 0,009 | | 0,095 | | 1,000 | | 0,469 | | 0,744 | |
| Odds Ratio (OR) | | 8,07 | | 4,68 | | 1,52 | | 0,49 | | 0,97 | |

| Kreuztest χ^2 | | HPV 45 AK | | HPV 6 AK | | HPV 11 AK | | mindestens ein high-risk HPV-Antikörper positiv | |
|--------------------------------------|-------|-----------|------|----------|-----|-----------|------|---|------|
| | | - | + | - | + | - | + | - | + |
| CIN I oder keine Dysplasie | beob. | 8 | 5 | 8 | 5 | 8 | 5 | 4 | 10 |
| | erw. | 7,8 | 5,2 | 9,6 | 3,4 | 8,6 | 4,4 | 1,6 | 12,4 |
| CIN II /III, CIS oder CA | beob. | 22 | 15 | 29 | 8 | 25 | 12 | 2 | 35 |
| | erw. | 22,2 | 14,8 | 27,4 | 9,6 | 24,4 | 12,6 | 4,4 | 32,6 |
| 2-seitiger Fishers Exakt-Test (p) | | 1,000 | | 0,281 | | 0,741 | | 0,041 | |
| Odds Ratio (OR) | | 1,10 | | 0,44 | | 0,77 | | 7,00 | |

Tabelle 3.5.1.1.: Statistischer Vergleich positiver IgG-Reaktivität gegen HPV-VLPs, zum Zeitpunkt der Erstuntersuchung, mit dem jeweils schlechtesten histologischen Ergebnis im Untersuchungszeitraum, unter zu Hilfenahme des Chi-Quadrat-Tests. Angegeben sind der beobachtete und der erwartete Wert (Wert der im Falle einer unabhängigen Verteilung erwartet würde). Die Testentscheidung, für oder gegen die Nullhypothese, ist als p -Wert im 2-seitigen Fishers-Exakt Test angegeben. Zusätzlich ist die Odds Ratio (OR) angegeben.

In Abbildung 3.5.1.1. sind die Ergebnisse für die statisch relevanten Gruppen, HPV 16, 18, und „mindestens ein nachweisbarer high-risk HPV-Typ“, grafisch dargestellt. So erreicht der Nachweis von HPV 16 mit 92% einen höheren positiven prädiktiven Wert als Marker für die Entwicklung schwerer Dysplasien als HPV 18 (89%) und der Nachweis mindestens eines high-risk HPV-Typen (78%). Jedoch nur, wenn keiner der sechs high-risk HPV-Typen nachgewiesen wurde, konnte der mit Abstand höchste negative prädiktive Wert erreicht werden (33% Negative, die schwere Dysplasien entwickelten, im Vergleich zu 56% bei HPV 16 und 63% bei HPV 18).

Wurden nur starke Antikörperreaktionen berücksichtigt, zum Beispiel ELISA-Werte die doppelt so hoch wie die unter 3.2 bestimmten Grenzwerte lagen, so ließ sich für die Gruppe mit mindestens einem nachweisbarem high-risk Antikörper der positive prädiktive Wert von 78% auf 83% steigern. Allerdings wurde dies zu Lasten des negativen prädiktiven Wertes erreicht (von 33% auf 59% falsch Negative) (siehe Abbildung 3.5.1.1.). Für HPV 16 und 18 alleine, konnte dieses Phänomen nicht gezeigt werden.

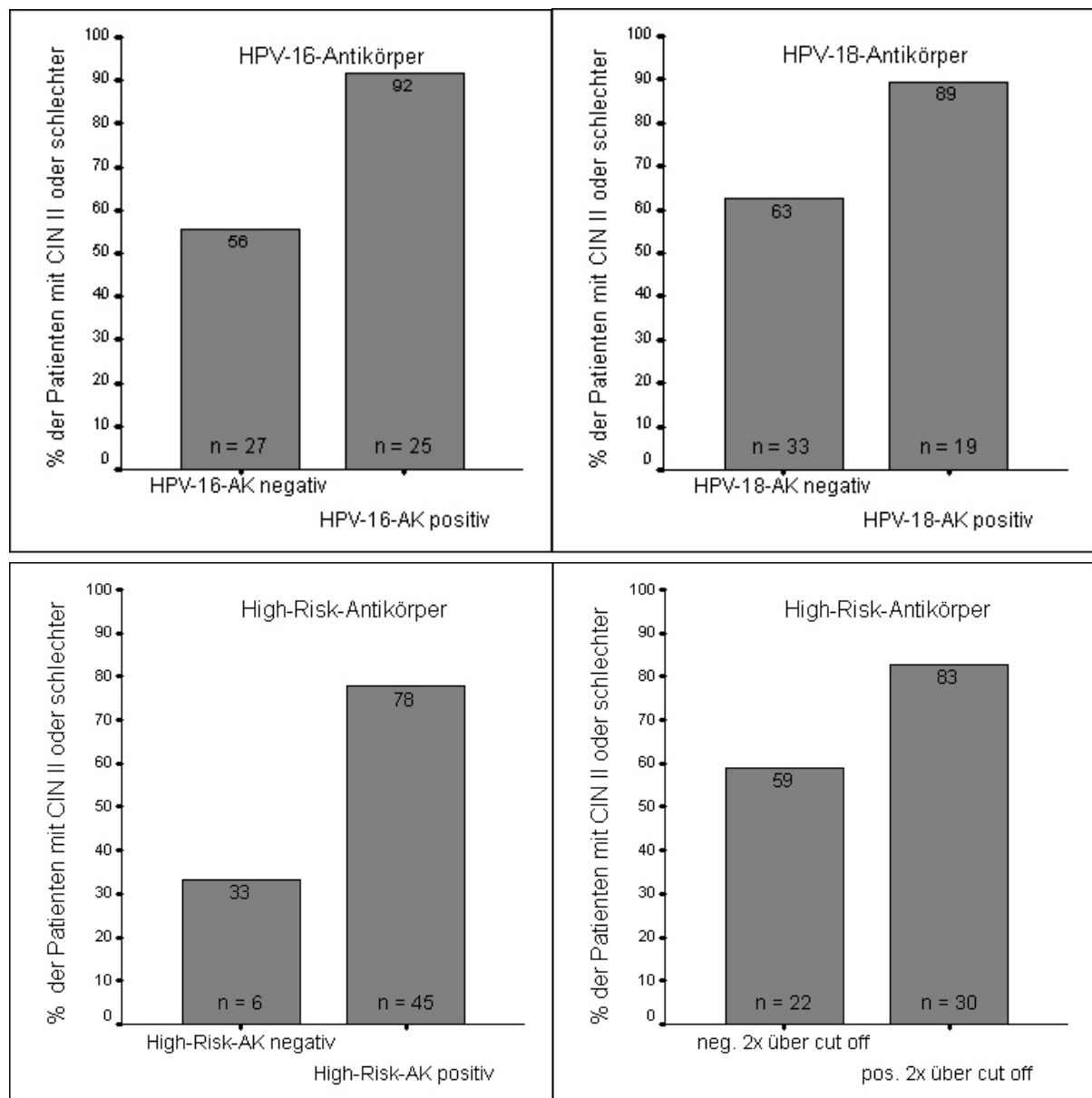


Abbildung 3.5.1.1. Prozent der Patientinnen, die eine schwere Dysplasie (Cervikale Intraepi-theliale Neoplasie Grad II/III (CIN II/III), Carzinoma in situ (CIS) oder Karzinom (CA)) entwickelten und bei der Erstuntersuchung Antikörper gegen HPV 16 oder 18 beziehungsweise „mindestens einen high-risk HPV-Typen“ nachweisbar hatten (letzte Gruppe mit Antikörpertitern über normalem Grenzwert und über doppeltem Grenzwert).

3.5.1.2. Verlauf der HPV-Antikörpernachweise im Vergleich zur Histologie

In der zweiten Analyse dieses Abschnitts sollte die Verlaufbeobachtung von spezifischen HPV-Antikörpertitern im Serum auf den Nutzen als prädiktiver Marker für die Entwicklung schwerer zervikaler Dysplasien getestet werden. Dazu wurde von jeder Patientin das histologische Ergebnis mit ausgeprägtester Dysplasie mit dem Titterverlauf der Antikörperreaktionen verglichen.

Abbildung 3.5.1.2. stellt in Grafik a. die Entwicklung einer schweren Dysplasie in Abhängigkeit des IgG-Reaktivitätsverlaufes **eines der sechs untersuchten high-risk HPV-Antikörpertypen** dar. Bei Mehrfachinfektionen wurde jeweils der Verlauf des am häufigsten nachgewiesenen Genotypen ausgewählt. Dabei zeigte sich eine höhere Frequenz schwerer Dysplasien bei Patientinnen mit mindestens einer persistierenden high-risk Antikörperreaktion (zu jedem Untersuchungstermin nachweisbare Antikörper) als bei Frauen mit nur fluktuierenden (nicht kontinuierlich nachweisbare oder seit 6 bis 18 Monaten nachweisbare Antikörper) oder abgefallenen high-risk Antikörperreaktionen (Antikörper > 12 Monate nicht mehr nachweisbar). Keine schweren Dysplasien wurden bei den Patientinnen ohne oder mit erst kürzlich erfolgter Serokonversion (< 6 Monate) gefunden. Der lineare Zusammenhang zwischen den hier dargestellten Antikörperverlaufsmustern und der Histologie war deutlich signifikant ($p = 0,007$, Chi-Quadrat-Test). Je öfter die gleichen Antikörpertypen nachgewiesen wurden desto häufiger entwickelten sich schwere Dysplasien. Auch der Gruppenvergleich von den Frauen mit persistierenden Antikörpern und denen ohne Nachweis von Antikörpern zeigte in Bezug auf die Histologie eine signifikante Varianz ($p = 0,011$, Mann-Whitney-Test). Aus Abbildung 3.5.1.2.b. geht ebenfalls hervor, dass mit Verschlechterung der Dysplasie der Anteil von Patientinnen mit persistierenden Antikörpern tendenziell anstieg (linearer Zusammenhang: $p = 0,105$, Chi-Quadrat-Test).

Beim Vergleich der **HPV-16-Antikörperverläufe** mit den histologischen Ergebnissen konnten die oben genannten Zusammenhänge noch deutlicher verifiziert werden. Der lineare Verlauf zwischen Histologie und Verlaufstypen (siehe auch Abbildung 3.5.1.2 c und d) war mit $p=0,001$ höchst signifikant bei einer mittleren Korrelation ($\rho = 0,495$; Spearmanscher Korrelationskoeffizient). Ebenso zeigte der Vergleich von der persistierender Gruppe mit der Gruppe ohne Nachweis von HPV-16-Antikörpern einen signifikanten Unterschied in Bezug auf die Entwicklung schwerer Dysplasien ($p=0,001$; Mann-Whitney-Test). Mit dem Grad der Dysplasie stieg auch der Anteil an Patienten mit persistierenden Antikörper signifikant an ($p=0,01$ Fishers Exakt Test).

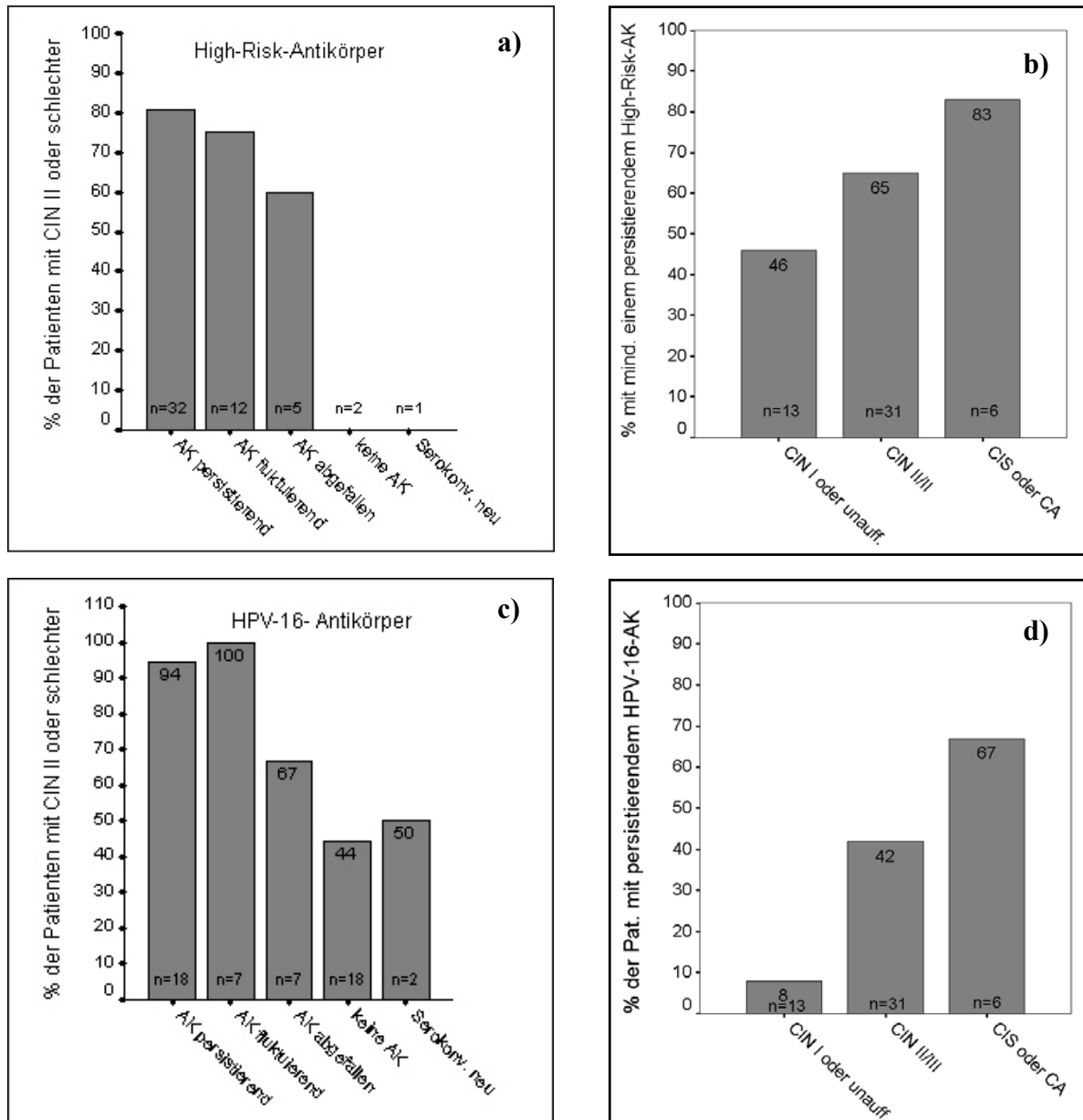


Abbildung 3.5.1.2.: Links: Vergleich der Antikörperverlaufsmuster von „mindestens eines high risk HPV-Genotypen“ (oben) bzw. von HPV 16 (unten) mit der Anzahl von Patienten (in Prozent), die CIN II/III, CIS oder CA in der histologischen Untersuchung aufwiesen. Rechts: Grad der Dysplasie in Abhängigkeit von dem Anteil Frauen mit persistierendem Antikörperverlauf in Prozent [high risk (oben) bzw. HPV 16 (unten)]. „n“ entspricht der Anzahl der Fälle in einer Gruppe)

Für HPV 18 konnte mit $p = 0,159$ (Anzahl der schweren Dysplasien verglichen mit Antikörperverlaufstyp, linear mit linear Zusammenhang, Chi-Quadrat-Test), $p = 0,107$ (persistierende verglichen mit nicht persistierender Gruppe, Mann-Whitney-Test) und $p = 0,257$ (Grad der Dysplasie verglichen mit dem Anteil persistierender Antikörper, linear mit linear Zusammenhang, Chi-Quadrat-Test) immerhin eine leichte Tendenz in die gleiche Richtung gezeigt wer-

den. Alle anderen HPV-Typen waren in dieser Einzeluntersuchung nicht signifikant.

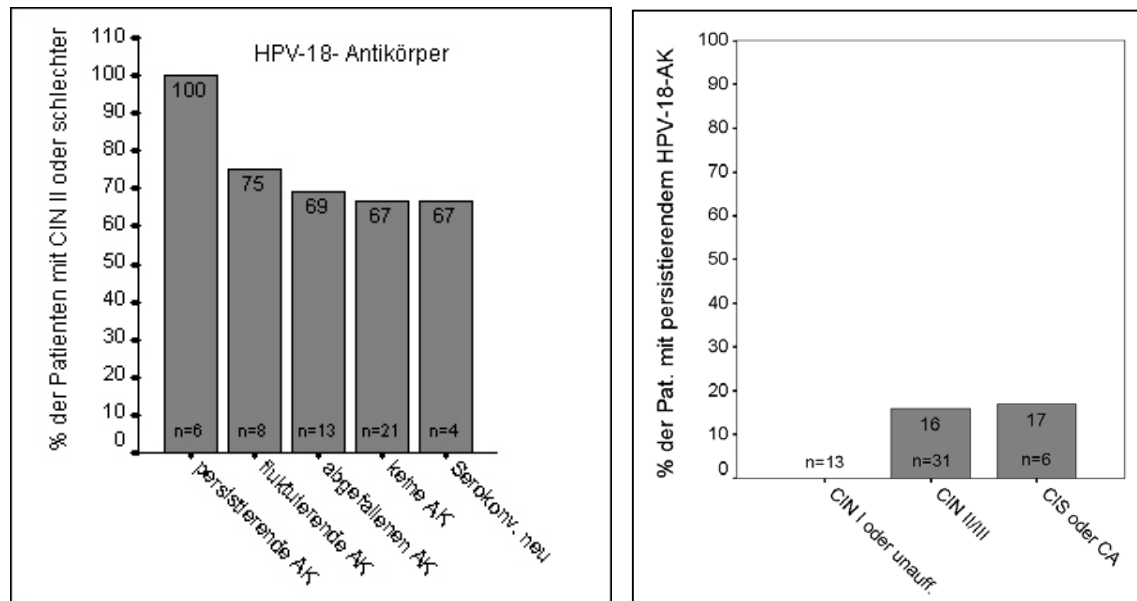


Abbildung 3.5.1.3.: Rechts: Vergleich der Antikörperversmuster von HPV 18 mit der Anzahl Patienten, die CIN II/III, CIS oder CA in der histologischen Untersuchung aufwiesen (in Prozent) Links: Grad der Dysplasie in Abhängigkeit von der Anzahl Frauen mit persistierendem HPV 18 Antikörperverlauf (in Prozent). „n“ entspricht der Fallzahl in einer Gruppe.

3.5.2.1. Einmalige HPV-DNA-Nachweise im Vergleich zur Histologie

In der folgenden Untersuchung sollte der Nachweis von spezifischer HPV-DNA im Zervixabstrich auf den Nutzen als prädiktiver Marker für die Entwicklung schwerer zervikaler Dysplasien getestet werden.

Dazu wurden die typenspezifisch nachgewiesenen HPV-DNAs zum Zeitpunkt der Erstuntersuchung mit dem schlechtesten histologischen Ergebnis im Beobachtungszeitraum der jeweiligen Patientinnen verglichen. Es konnte für den Nachweis von HPV-16-DNA eine stark positive ($p=0,057$, Fishers Exakt Test) und für HPV 58 eine stark negative ($p=0,051$) Tendenz des Zusammenhangs berechnet werden. Alle anderen DNA-Nachweise zum Zeitpunkt des Erstbesuches zeigten keinen statistischen Zusammenhang mit dem histologische Ergebnis. Allerdings war die Wahrscheinlichkeitsberechnung für die HPV-Typen 26, 68, MM4, 40, 42 und 57 wegen der mangelnden Prävalenz in der untersuchten Population nicht möglich. Auch der Nachweis mindestens eines high-risk HPV-DNA-Typen zum Erstbesuch stand in keiner Beziehung zur späteren Histologie ($p=1,000$). (vergleiche Tabellen 3.5.2.1)

| Kreuztest χ^2 | | HPV 16 DNA | | HPV 18 DNA | | HPV 26 DNA | | HPV 31 DNA | | HPV 33 DNA | | HPV 35 DNA | | HPV 39 DNA | |
|---|-------|-------------------|------|---------------|-----|---------------|---|---------------|-----|---------------|-----|---------------|-----|---------------|-----|
| | | - | + | - | + | - | + | - | + | - | + | - | + | - | + |
| CIN I oder besser | beob. | 8 | 6 | 10 | 4 | 14 | | 14 | 0 | 14 | 0 | 14 | 0 | 14 | 0 |
| | erw. | 4,9 | 9,1 | 11,5 | 2,5 | 14,0 | | 13,7 | 0,3 | 12,9 | 1,1 | 13,5 | 0,5 | 13,2 | 0,8 |
| CIN II oder schlech- ter | beob. | 10 | 27 | 32 | 5 | 37 | | 36 | 1 | 33 | 4 | 35 | 2 | 34 | 3 |
| | erw. | 13,1 | 23,9 | 30,5 | 6,5 | 37,0 | | 36,3 | 0,7 | 34,1 | 2,9 | 35,5 | 1,5 | 34,8 | 2,2 |
| 2-seitiger Fishers Exakt-Test (p) | | 0,057 (OR=3,6) | | 0,236 | | | | 1,000 | | 0,565 | | 1,000 | | 0,552 | |

| Kreuztest χ^2 | | HPV 45 DNA | | HPV 51 DNA | | HPV 52 DNA | | HPV 55 DNA | | HPV 56 DNA | | HPV 58 DNA | | HPV 59 DNA | |
|---|-------|---------------|-----|-------------------|-----|-------------------|-----|-------------------|-----|-------------------------|------|---------------|-----|----------------|-----|
| | | - | + | - | + | - | + | - | + | - | + | - | + | - | + |
| CIN I oder besser | beob. | 11 | 3 | 9 | 5 | 12 | 2 | 12 | 2 | 13 | 1 | 8 | 6 | 13 | 1 |
| | erw. | 12,1 | 1,9 | 11,0 | 3,0 | 11,0 | 3,0 | 13,2 | 0,8 | 12,6 | 1,4 | 11,0 | 3,0 | 12,6 | 1,4 |
| CIN II oder schlechter | beob. | 33 | 4 | 31 | 6 | 28 | 9 | 36 | 1 | 33 | 4 | 32 | 5 | 33 | 4 |
| | erw. | 31,9 | 5,1 | 29,0 | 8,0 | 29,0 | 8,0 | 34,8 | 2,2 | 33,4 | 3,6 | 29,0 | 8,0 | 33,4 | 3,6 |
| 2-seitiger Fishers Exakt-Test (<i>p</i>) | | 0,375 | | 0,148 | | 0,705 | | 0,179 | | 1,000 | | 0,051 | | 1,000 | |
| Kreuztest χ^2 | | HPV 68 DNA | | HPV MM4 DNA | | HPV MM7 DNA | | HPV MM9 DNA | | HPV high risk DNA | | HPV 6 DNA | | HPV 11 DNA | |
| | | - | + | - | + | - | + | - | + | - | + | - | + | - | + |
| CIN I oder besser | beob. | 14 | | 14 | | 14 | 0 | 14 | 0 | 1 | 13 | 12 | 2 | 13 | 1 |
| | erw. | 14,0 | | 14,0 | | 13,7 | 0,3 | 13,5 | 0,5 | 0,8 | 13,2 | 10,4 | 3,6 | 13,2 | 0,8 |
| CIN II oder schlechter | beob. | 37 | | 37 | | 36 | 1 | 35 | 2 | 2 | 35 | 26 | 11 | 35 | 2 |
| | erw. | 37,0 | | 37,0 | | 36,3 | 0,7 | 35,5 | 1,5 | 2,2 | 34,8 | 27,6 | 9,6 | 34,8 | 2,2 |
| 2-seitiger Fishers Exakt-Test (<i>p</i>) | | | | | | 1,000 | | 1,000 | | 1,000 | | 0,472 | | 1,000 | |
| Kreuztest χ^2 | | HPV 40 DNA | | HPV 42 DNA | | HPV 53 DNA | | HPV 54 DNA | | HPV 57 DNA | | HPV 66 DNA | | HPV MM8 DNA | |
| | | - | + | - | + | - | + | - | + | - | + | - | + | - | + |
| CIN I oder besser | beob. | 14 | | 14 | | 14 | 0 | 13 | 1 | 14 | | 13 | 1 | 13 | 1 |
| | erw. | 14,0 | | 14,0 | | 13,7 | 0,3 | 13,5 | 0,5 | 14,0 | | 13,7 | 0,3 | 13,7 | 0,3 |
| CIN II oder schlechter | beob. | 37 | | 37 | | 36 | 1 | 36 | 1 | 37 | | 37 | 0 | 37 | 0 |
| | erw. | 37,0 | | 37,0 | | 36,3 | 0,7 | 35,5 | 1,5 | 37,0 | | 36,5 | 0,7 | 36,5 | 0,7 |
| 2-seitiger Fishers Exakt-Test (<i>p</i>) | | | | | | 1,000 | | 0,478 | | | | 0,275 | | 0,275 | |

Tabelle 3.5.2.1.: Statistischer Vergleich von typenspezifischen HPV-DNA-Nachweisen im Zervixabstrich zum Zeitpunkt der Erstuntersuchung mit dem schlechtesten histologischen Ergebnis im Untersuchungszeitraum der jeweiligen Patientinnen unter zu Hilfenahme des Chi-Quadrat-Tests. Die Korrelation ist als *p* –Wert im 2-seitigen Fishers Exakt Test angegeben.

3.5.2.2. Verlauf der HPV-DNA-Nachweise im Vergleich zur Histologie

In der zweiten Analyse dieser Untersuchung sollte die Verlaufsbeobachtung von HPV-DNA-Nachweisen auf den Nutzen als prädiktiver Marker für die Entwicklung schwerer zervikaler Dysplasien getestet werden. Dazu wurde von jeder Patientin das histologische Ergebnis mit ausgeprägtester Dysplasie im Untersuchungszeitraum mit verschiedenen Verläufen der HPV-DNA-Nachweise korreliert. Die Einteilung der Verlaufsmuster erfolgte wie in Kapitel 3.3.

Abbildung 3.5.2.2. zeigt bei Patientinnen mit persistierender **high-risk DNA** ein signifikant häufigeres Fortschreiten (83%) der zervikalen Veränderungen zur schweren Dysplasie (CIN II/III, CIS oder CA) als bei Frauen mit fluktuierender Infektion (44%, $p=0,021$, Mann-Whitney-Test). Eine ähnliche Beobachtung, jedoch nur mit geringer Tendenz, ließ sich auch im Vergleich zur Gruppe mit überwundener Infektion feststellen (60%, $p=0,131$). Da jeweils nur eine Patientin keine Infektion oder eine Neuinfektion mit high-risk HPV zeigte, sind die hier rein rechnerischen 100% nicht als repräsentativ anzusehen. Ein linearer Zusammenhang der Variablen wie bei den Antikörpervläufen konnte hier nicht gezeigt werden ($p=0,321$; Chi-Quadrat-Test).

Dem entgegen war das lineare Verhältnis zwischen dem Nachweis einer persistierenden high-risk HPV-DNA und dem Grad der zervikalen intraepithelialen Neoplasie (CIN-Klassifikation) deutlich signifikant ($p=0,041$, Chi-Quadrat-Test). Nur 36% der Patientinnen mit leichter Dysplasie oder unauffälliger Histologie hatten persistierende high-risk DNAs im Gegensatz zu 68% der Frauen mit CIN II/III, CIS oder CA ($p=0,057$, Fishers Exakt Test). Je ausgeprägter die Dysplasie war, desto höher war der Anteil an Patienten mit vorausgegangener persistierender high-risk HPV-DNA. Die Korrelation war jedoch nur gering ($\rho=0,289$ Spearmanscher Korrelationskoeffizient).

Wurden die einzelnen HPV-Infektionsverläufe isoliert mit der Histologie verglichen, konnten nur im Fall von **HPV-16-DNA-Nachweis** ähnliche Zusammenhänge beobachtet werden (siehe Abbildung 3.5.2.1.). Patientinnen mit persistierender HPV-16-DNA hatten mit 90% eine deutlich höhere Wahrscheinlichkeit eine schwere Dysplasie zu entwickeln, als die Gruppen fluktuierende Infektion (50%; $p=0,013$; Mann-Whitney-Test), überwundene Infektion (75%; $p=0,288$), keine Infektion (50%; $p=0,112$) und Neuinfektion (60%; $p=0,048$). Auch eine Tendenz zum linearen Zusammenhang ($p=0,93$; Chi-Quadrat-Test), jedoch nur mit geringer Korrelation ($\rho=-0,275$ Spearmanscher Korrelationskoeffizient), konnte für diese Infektionsmodelle gezeigt werden.

Auch der Vergleich zwischen Grad der Dysplasie und dem Anteil an Frauen mit persistierender HPV-16-DNA im Vorfeld war signifikant linear ($p=0,017$, Chi-Quadrat-Test) mit einer

geringen Korrelation ($\rho=0,336$; Spearmanscher Korrelationskoeffizient). Nur 14% der Patienten mit CIN I oder unauffälliger Histologie hatten vorher persistierende HPV-16-DNA im Gegensatz zu 51 % der Frauen mit CIN II oder höhergradigen Dysplasie ($p= 0,025$, Fishers Exakt Test).

Für alle anderen HPV-Typen konnte kein Zusammenhang gezeigt werden. Allerdings ist zu beachten, dass fast alle Patientinnen der untersuchten Population Mehrfachinfektionen aufwiesen, was eine Aussage für einzelne Typen erschwerte.

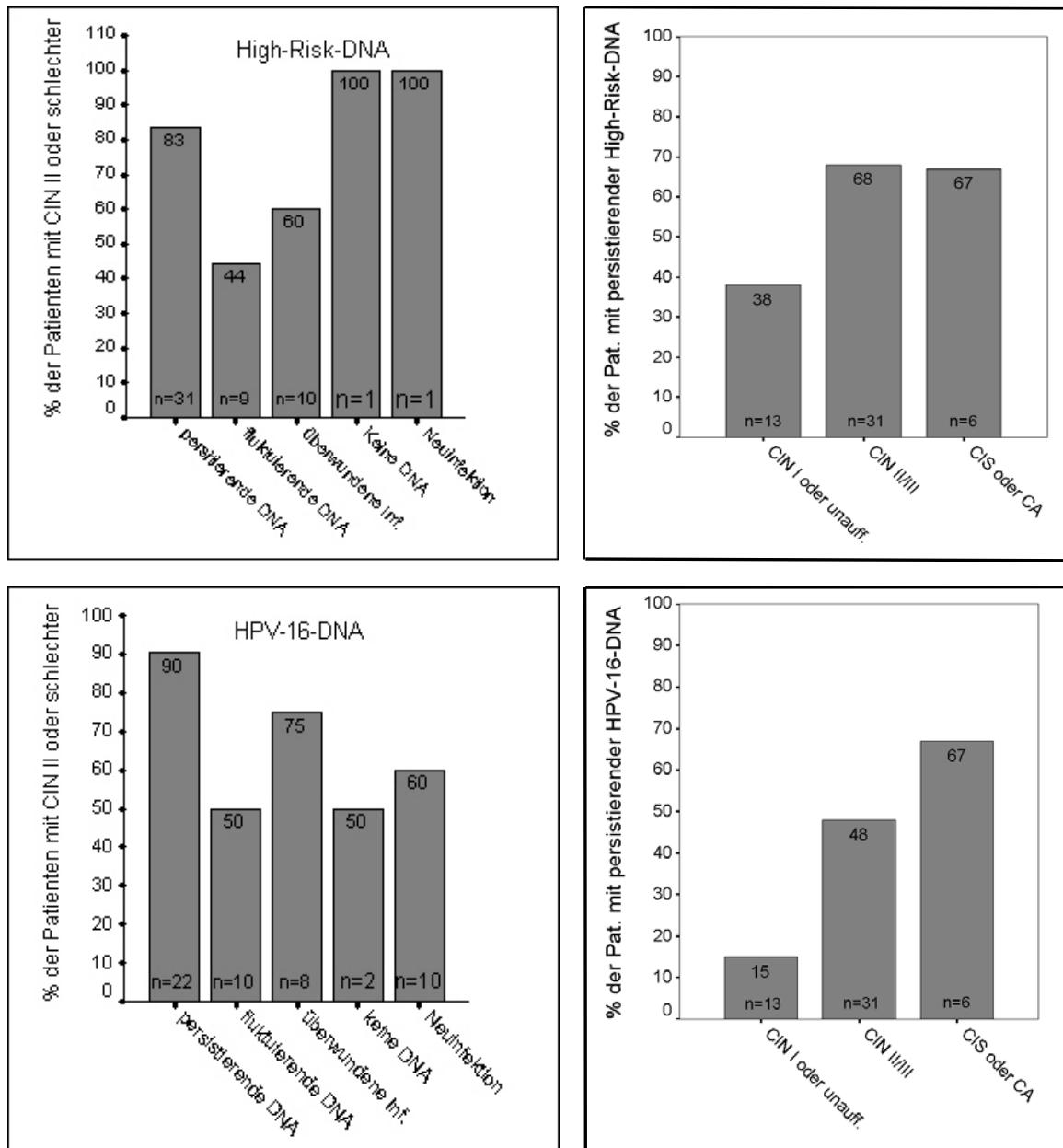


Abbildung 3.5.2.1.: Links: Vergleich „mindestens eines high-risk HPV“- bzw. HPV 16 Infektionsverlaufes mit der Anzahl von Patienten, die CIN II oder höhergradige Dysplasien in der histologischen Untersuchung aufwiesen (in Prozent). Rechts: Anteil der Frauen mit persistierendem high-risk DNA bzw. persistierendem HPV-16-DNA-Verlauf in Abhängigkeit vom Grad der Dysplasie. (n = Anzahl der Fälle)

3.5.3 Kombination der DNA- und Antikörpernachweise im Vergleich zur Histologie

Bei dieser Untersuchung sollte geprüft werden, welche Kombination von typenspezifischen Antikörper- und DNA-Nachweisen den besten prognostischen Test für das histologische Ergebnis darstellt.

Tabelle 3.5.3 stellt einige Testkombinationen und deren statistische Auswertung gegenüber. Der einmalige Nachweis von high-risk DNA oder high-risk Antikörpern zeigte keine Bedeutung für das histologische Ergebnis ($p = 0,456$). Allerdings war der kombinierte Nachweis eines high-risk Antikörpers zum Zeitpunkt der Erstuntersuchung oder einer persistierenden high-risk DNA, signifikant mit der Entwicklung einer schweren Dysplasie verbunden ($p = 0,017$, $OR=14,4$). Da jedoch zwei der erwarteten Werte im Chi-Quadrat-Test (50%) unter fünf lagen (sehr geringe Fallzahl) ist dieses Ergebnis statistisch gesehen nicht einwandfrei gültig.

Wurden bei der Untersuchung nur Patientinnen, die einmalig high-risk Antikörper zweifach über dem Grenzwert oder persistierende high-risk DNA aufwiesen als positiv angesehen, zeigte sich ein noch höherer signifikanter Zusammenhang mit der Entwicklung von CIN II- bis CA-Läsionen ($p=0,001$; $OR=11$). Auch gegenüber dem Nachweis persistierender high-risk Antikörper oder persistierender high-risk DNA als positives Ergebnis ($p = 0,003$, $OR=8,53$) zeigte diese Kombination eine höher Signifikanz in Bezug auf eine schwere Dysplasie.

Den Test mit der höchsten Signifikanz stellte der Nachweis eines HPV-16-Antikörpers zum Erstbesuch oder persistierender HPV-16-DNA als Annahme für ein positives Ergebnis dar ($p < 0,001$; $OR=18,67$). Von 37 Patientinnen, die CIN II oder eine höhergradige Dysplasie in der histologischen Untersuchung aufwiesen, waren 28 bei Anwendung dieser Testkombination positiv im Gegensatz zu nur 2 von 14 Frauen mit einer leichten (CIN I) oder keiner Dysplasie.

Unter den signifikanten Tests, hatte der fehlende Nachweis eines high-risk Antikörpers oder einer persistierenden high-risk DNA mit nur 20% falsch Negativen, den besten negativen prädiktiven Wert. Allerdings war der positive prädiktive Wert, mit nur 7 % falsch positiven, beim Nachweis von HPV-16-Antikörpern oder persistierender HPV-16-DNA am besten. Als Test mit der besten Validität, also akzeptablen negativen und positiven prädiktiven Werten erschien der Nachweis, eines high-risk Antikörpers zweifach über dem Grenzwert oder der Nachweis einer persistierenden DNA. Die Validität muss allerdings im Einzelfall, im Kontext der klinischen Anwendung beurteilt werden.

| Kreuztest χ^2 | | high-risk AK oder DNA zum Erstbesuch | | high-risk AK zum Erstbesuch oder pers. high risk DNA | | persistier- ender high- risk AK oder DNA | | high-risk AK 2fach über cut-off zum Erstbesuch oder pers. high risk DNA | | HPV-16-AK Erstbesuch oder pers. HPV 16 DNA | |
|--|-------|---|------|---|------|---|------|---|------|--|------|
| | | - | + | - | + | - | + | - | + | - | + |
| CIN I oder besser | beob. | 1 | 12 | 4 | 10 | 8 | 6 | 8 | 6 | 12 | 2 |
| | erw. | 0,5 | 12,5 | 1,4 | 12,6 | 3,6 | 10,4 | 3,3 | 10,7 | 5,8 | 8,2 |
| CIN II oder schlechter | beob. | 1 | 36 | 1 | 36 | 5 | 32 | 4 | 33 | 9 | 28 |
| | erw. | 1,5 | 35,5 | 3,6 | 33,4 | 9,4 | 27,6 | 8,7 | 28,3 | 15,2 | 21,8 |
| 2-seitiger Fishers Exact Test (p) | | 0,456 | | 0,017 | | 0,003 | | 0,001 | | < 0,001 | |
| Odds Ratio (OR) | | 3,00 | | 14,40 | | 8,53 | | 11,00 | | 18,67 | |

Tabelle 3.5.3: Vergleich einiger Testkombinationen aus Antikörper- und DNA-Nachweis mit dem histologischen Ergebnis in Form einer Kreutztabelle. Dargestellt sind der beobachtete und der erwartete Wert (Wert der im Falle einer unabhängigen Verteilung erwartet würde). Das statistische Ergebnis ist als Fishers Exakt Test (p) bzw. Odds Ratio (OR) angegeben.

3.6. Prüfung von anamnestischen Parametern auf Risiko- beziehungsweise Kofaktoren für die Entwicklung schwerer intraepithelialer Neoplasien

In diesem Abschnitt sollten in unserer Population Rauchen, Übergewichtigkeit, die Einnahme von orale Kontrazeptiva, die Anzahl von Schwangerschaft, eine frühe Menarche und das Bildungsniveau auf mögliche Risikofaktoren für die Entwicklung schwerer intraepitheliale Neoplasien untersucht werden. Um eine Abhängigkeit dieser Risikofaktoren von einer HPV-Infektion auszuschließen wurden die Parameter sowohl unter Einbeziehung aller Patientinnen als auch unter Ausschluss der Frauen mit nachweisbaren HPV-16-Antikörpern am Erstbesuch oder persistierender HPV-16-DNA getestet.

Zunächst wurde das **Rauchen** von Zigaretten in Zusammenhang mit der Entwicklung einer schweren Dysplasie untersucht. Die in der Studie befragten Frauen wurden in drei Gruppen aufgeteilt: Nichtraucher (n=25), Frauen die weniger als zehn Zigaretten pro Tag (n=9) und Frauen die mehr als zehn Zigaretten pro Tag rauchten (n=13). 79% der Nichtraucher entwickelten eine schwere Dysplasie im Vergleich zu 67 % der leichten bzw. 69% der starken Raucherinnen. Es zeigte sich folglich kein Tendenz zur Abhängigkeit der Variablen Rauchen und schwere Dysplasie ($p=0,692$, asymptotische 2-seitige Signifikanz, Chi-Quadrat-Test nach Pearson). Auch nach Ausschluss der HPV 16 infizierten Patientinnen waren die Raucher und Nichtraucher in Bezug auf CIN II oder höhergradige Läsionen mit 40% bis 43% etwa gleichverteilt ($p=0,994$).

Übergewichtige (Definition nach Body-Mass-Index; siehe 2.1.1.) entwickelten in der untersuchten Population häufiger eine schwerer Dysplasien (89%; n=9) als Normalgewichtige (70%; n=37). Nach Ausschluss der HPV-16-infizierten Frauen, wurde dieser Unterschied noch deutlicher. 67% (n=16) der Übergewichtigen entwickelten hier eine schwere Dysplasie im Vergleich zu 38%(n=3) der Normalgewichtigen. Allerdings waren die Varianzen in beiden Fällen nicht signifikant ($p=0,409$ und $p=0,546$, Fishers Exakt Test).

Um zu untersuchen ob die Anzahl der **Schwangerschaften** in Zusammenhang mit der Entwicklung einer schweren Dysplasie steht, wurde in drei Gruppen aufgeteilt: Frauen mit keiner, mit einer und mit zwei oder mehr zurückliegenden Schwangerschaften. Als Schwangerschaften wurden Regelgeburten, Aborte und Abtreibungen gewertet.

Bei der Einbeziehung aller Patientinnen wurden mit zunehmender Anzahl an Graviditäten

etwas häufiger CIN II bis CA-Läsionen am Zervix entwickelt. In der Gruppe ohne HPV 16 Nachweis zeigt sich kein einheitliches Bild. 44% (n=9) ohne Schwangerschaft in der Vergangenheit hatten im Gegensatz zu 50%(n=8) mit einer und 33% (n=33) mit zwei und mehr Graviditäten eine schwere Dysplasie. Entsprechend ließ sich in keinem Fall ein signifikante Abhängigkeit zwischen der Entwicklung einer schweren Dysplasie und einer oder mehr Schwangerschaften herstellen ($p=0,843$ und $p=0,884$, Chi-Quadrat-Test).

Bei der Untersuchung von **oralen Kontrazeptiva** in Verbindung mit der Entwicklung schwerer Dysplasien zeigte sich folgendes Ergebnis. Die Frauen die keine Pille als Verhütungsmethode wählten hatten sowohl bei Einbeziehung aller Patientinnen als auch bei ausschließlicher Betrachtung der HPV-16-negativen Gruppe prozentual ein schlechteres histologisches Ergebnis. Die Differenzen waren jedoch auch hier nur sehr gering und somit nicht signifikant ($p = 1,000$ und $p = 1,000$, Fishers Exakt Test)

Eine **frühe Menarche**, vor dem 13. Lebensjahr, zeigte mit $p = 0,095$ eine deutlich höhere Tendenz zur Entwicklung einer CIN II/CIN III, CIS oder CA-Veränderung, als eine spätere Menarche (nach dem 13. Lebensjahr). Unabhängig von HPV 16, waren auch in der Gruppe mit früher Menarche, die schweren Dysplasien häufiger (60%; n=5), als in der mit erster Regelblutung nach dem 13. Lebensjahr (36%; n=14). Eine statistisch relevante Varianz konnte jedoch nicht berechnet werden ($p = 0,603$).

Zuletzt wurden die Patienten nach ihrem **Bildungsniveau** in Akademikerinnen, Frauen mit abgeschlossener Ausbildung und Frauen ohne Ausbildung eingeteilt. Alle Gruppen zeigten ähnliche Tendenzen zur Entwicklung einer schweren Dysplasie, sowohl insgesamt als auch HPV-16-unabhängig. Folglich ließen sich auch keine statistischen Zusammenhänge für die Variablen Bildungsstatus und schwere Dysplasie berechnen ($p = 0,983$ und $p = 0,981$).

4.1. Prävalenz von HPV-DNA und HPV-Antikörpern

4.1.1. HPV-DNA-Prävalenz

Ein genaues Verständnis über die HPV-Prävalenz und die Verteilung der einzelnen Genotypen in einer definierten Population ist die Grundlage für die spätere Planung von diagnostischen und präventiven Strategien bei HPV-assoziierten Krankheiten. Eine umfassende Studie der Weltgesundheitsorganisation in 22 Ländern der Erde hat große Variationen des HPV-DNA-Spektrums bei Zervixkarzinomen in unterschiedlichen Regionen und Kulturen gezeigt (Bosch et al., 1995). Da dennoch nur wenig über die HPV-typenspezifische Verteilung in Zentraleuropa bekannt ist, wurden die HPV-DNA-Prävalenz und das HPV-DNA-Spektrum bei Frauen mit rezidivierenden Dysplasien in Deutschland untersucht.

Insgesamt 178 Zervixabstriche von 52 Patientinnen wurden für die HPV-Typisierung gesammelt. Unter den 52 Proben die beim Erstbesuch der Frauen in der I. Universitätsfrauenklinik München entnommen wurden, waren 98% HPV-DNA positiv für mindestens einen der 27 untersuchten Genotypen. Eine Prävalenz die auch andere Studien mit ähnlicher Population beobachtet haben. In Abhängigkeit von der verwendeten Methode wurde in diesen Arbeiten HPV-DNA zu 35%-100% bei Dysplasiepatientinnen (IARC Working group on the evaluation of carcinogenic risks to humans, 1995) und zu 93%-100% bei Zervixkarzinompatientinnen gefunden (Bosch et al., 1995; Jacobs et al., 1997).

73% der Frauen unserer Studienpopulation wiesen Mehrfachinfektionen mit HPV auf, wobei durchschnittlich drei verschiedene Genotypen in einer Probe gefunden wurden. Deutlich mehr als in anderen Arbeiten, die nur 10% (Chang et al., 2002) bis 16,4% (Tachezy et al., 1999) Mehrfachinfektionen nachweisen konnten. Allerdings untersuchten diese Studien einerseits eine geringeres Spektrum an HPV-Typen (26 bzw. 22) andererseits wiesen sie unterschiedlich hohe Dysplasieraten auf. Möglicherweise könnte auch eine höhere Sensitivität der bei uns verwendeten Methode zur Genotypisierung ursächlich für diese deutliche Diskrepanz sein.

Der mit Abstand am häufigsten nachgewiesene HPV-DNA-Typ war 16, der in 65% der Proben gefunden wurde. Am zweithäufigsten waren HPV 52, 58 und 6 in jeweils 23% der Fälle nachweisbar. Erst am dritthäufigsten, allerdings nur mit wenig geringerer Prävalenz, wurden HPV 18 und HPV 51 mit jeweils 21% gefunden. Gefolgt von HPV 45 mit 15%, HPV 56, 59 und 11 mit jeweils 10%, HPV 33, 39, 55 und MM9 mit jeweils 6% und schließlich HPV 35, MM7 und 54 mit jeweils 4%. Am seltensten waren die HPV Typen 31, 26, 53, 66,

und MM 8 mit jeweils 2% positiven Nachweisen. Die HPV-Typen 68, MM4, 40, 42, und 57 konnten in dieser Population zumindest zum Erstbesuch nicht nachgewiesen werden.

Auch in anderen Arbeiten weltweit zeigte sich HPV 16 sowohl unter Dysplasiepatientinnen als auch in zytologisch unauffälligen Kontrollgruppen ausnahmslos als der häufigste Genotyp (IARC Working Group on the evaluation of carcinogenic risks to humans, 1995). Allerdings berechneten fast alle Prävalenzstudien unterschiedliche Häufigkeitsverteilungen für die anderen genitalen HPV-Typen. Zum Beispiel wurde in der internationalen Untersuchung von Bosch et al., 1995 (IBSCC) HPV 18 als zweithäufigster, HPV 45 als dritthäufigster und HPV 31 als vierthäufigster Genotyp in Zervixkarzinombiopsien gefunden. In der Untergruppe für Europa mit Proben aus Polen, Spanien und Deutschland ergab sich die Häufigkeitsverteilung in der Reihenfolge 16, 18, 31, 45. Eine andere Arbeitsgruppe aus Hong Kong wiesen dagegen, ähnlich wie bei dieser Arbeit, HPV 58 als den zweithäufigsten HPV-Typen unter Patienten mit zervikalen Veränderungen nach (Chan et al., 1999). Eine mit der vorliegenden Arbeit vom Aufbau gut vergleichbare Studie aus Tschechien, die ebenfalls Patientinnen mit auffälligen Zervixabstrichen untersuchte, kam mit Ausnahme von HPV 16 und 18, wiederum zu einer anderen Häufigkeitsverteilung der einzelnen HPV-Typen (Tachezy et al., 1999).

Trotz aller Abweichungen zeigten diese Arbeiten aber zumindest gemeinsame Tendenzen. HPV 16 war bei allen Studien der mit Abstand häufigste Typ, gefolgt von einer Gruppe mit deutlich weniger aber untereinander ähnlicher Prävalenz (bei allen gleich HPV 18, 58, 45) und einer dritten Gruppe von HPV-Typen, die nur sehr selten nachgewiesen wurden (bei allen gleich HPV 40, 42, 66, MM4, MM8).

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich auch, dass viele HPV-DNA-Typen nur sehr kurzfristig, oft nur zu einem Untersuchungszeitpunkt, nachgewiesen werden konnten. Dies lässt vermuten, dass die meisten HPV-Infektionen schnell und spontan überwunden werden (Evander et al., 1995; Olson et al., 1997; Ho et al., 1998). Unterstützt wird diese These von einer Fallkontrollstudie von Ho et al. (1998), in der bei 95% anfangs HPV-positiven Probanden, nach spätestens 10 Monaten keine entsprechende DNA mehr nachweisbar waren. Auch bei Evander et al. (1995) neutralisierte die Mehrheit der Probanden die virale HPV-DNA innerhalb von zwei Jahren. Dennoch unklar bleibt, ob es sich bei diesen DNA-Nachweisen, um eine wirkliche Infektion oder nur um einen extrazellulären DNA-Nachweis gehandelt hat, zum Beispiel im Sinne eines sporadischen Nachweises nach Geschlechtsverkehr mit einem HPV positiven Partner.

4.1.2. HPV-Antikörper-Prävalenz

Um zu prüfen, in wie weit HPV-Antikörper in unserer Studienpopulation vorhanden waren, wurden ebenfalls 178 Serumproben auf die IgG-Reaktivität gegen acht verschiedenen HPV-Genotypen untersucht. Dabei wurden die HPV-Typen 16, 18, 31, 33, 35, 45, 6 und 11 ausgewählt, deren Antikörper bereits bei einer Vielzahl zervikaler Karzinome gefunden wurden (Munoz et al., 2000).

Die Prävalenz dieser Antikörper lag in der vorliegenden Studienpopulation deutlich höher als in den weltweiten Kontrollgruppen (vergleiche Tabelle 4.1). 90,4 % der Frauen zeigten eine Seroreaktivität gegen mindestens einen der acht untersuchten HPV-Typen. Dies zeigt einen engen Zusammenhang zwischen HPV-Antikörnernachweisen und zervikalen Dysplasien (siehe auch Punkt 4.4). HPV 16 war mit 50% der mit Abstand am häufigsten detektierte Antikörper, ähnlich wie bei Wideroff et al. (1999) in Österreich mit 51,2% und Combita et al. (2002) in Kolumbien mit 55% positiven Nachweisen.

40,3 % unserer Studienpopulation zeigten Seroreaktivität gegen mindestens einen der HPV-Typen 18, 31, 33, 35, 45, 6 und 11 in Abwesenheit von HPV-16-Antikörpern. Ein Hinweis dafür, dass serologische Untersuchungen auf weitere HPV-Typen, neben 16, wichtige zusätzliche Informationen zur Aufdeckung weiterer onkogener HPV-Infektionen bieten. Die wenigen Studien, die bisher neben HPV 16 auch weitere Genotypen in ihre serologischen Untersuchungen mit einbezogen haben, sind in der Tabelle 4.1. zusammengefasst. HPV 18 und HPV 33 Antikörper lagen mit einer Prävalenz von 34,6% und 25,0% etwa im Mittelfeld verglichen zu den anderen Arbeiten (11,2 bis 42,2 % bzw. 11,6 bis 30,9%), während HPV 31 mit 19,2% deutlich seltener im Vergleich zu anderen Ländern gefunden wurde (25,0 bis 33,7%). Hingegen wurde HPV 45 mit 42,3% deutlich häufiger als in den Vergleichstudien bei Wideroff et al. (1999) (17,5%) und bei Marais et al. (2000 b) (28,5%) gefunden. Erstmalig wurde bei der vorliegenden Arbeit die Seroprävalenz von HPV 35 in einer Dysplasiegruppe dokumentiert. Mit 40,5% positiven Nachweisen scheinen sehr viele dieser Patientinnen mit HPV 35 in Kontakt gekommen zu sein.

| Diagnose | Land und Anzahl der Probanden | Untersuchte Fälle positiv in der Serologie in %/ /Kontrollgruppe positiv in der Serologie in % | | | | | | | | Literaturangabe |
|------------------------|-------------------------------|---|----------------------|----------------------|----------------------|-------------|----------------------|-------------|-------------|-----------------------|
| | | 16 | 18 | 31 | 33 | 35 | 45 | 6 | 11 | |
| Dysplasien | Deutschland n=52 | 50,0 | 34,6 | 19,2 | 25,0 | 40,4 | 42,3 | 25,0 | 36,5 | Eigene Daten |
| Dysplasien | Österreich | 51,2/ 15,8 | 11,2/ 6,5 | 25,0/ 10,1 | | | 17,5/ 5,8 | | | Wideroff et al., 1999 |
| Zervix Karzinom | Schweden | 37,0/ 17,7 | 29,2/ 20,1 | | 30,9/ 23,0 | | | | | Wang et al., 1997 |
| Dysplasien | Schweden | 36,0/ 16,0 | 18,0/ 15,0 | | 20,0/ 18,0 | | | | | Chua et al., 1996 |
| Normalbe- völkerung | Namibia n=101 | 16,8 | 18,8 | 12,9 | 17,8 | | 22,8 | | | Marais et al., 2000 a |
| Dysplasien | Südafrika n=95 | 44,2/ 25,3 | 20,0/ 10,5 | 33,7/ 23,2 | 11,6/ 8,4 | | 28,5/ 13,7 | | | Marais et al., 2000 b |
| Zervix Karzinom | Kolumbien n=147/n=147 | 55,1/ 17,7 | 42,2/ 20,4 | 29,3/ 12,2 | 17,0/ 8,8 | | | | | Combata et al., 2002 |

Tabelle 4.1.: Seroreaktivität gegen HPV 16, 18, 31, 33, 35, 45, 6 und 11 bei Patientinnen mit Präkanzerosen oder Zervixkarzinomen sowie Kontrollgruppen.

Bei mehr als 76% der seroreaktiven Frauen waren Antikörper gegen mehr als einen HPV-Typen gleichzeitig nachweisbar. Im Durchschnitt wurden unsere Patientinnen für drei der acht untersuchten HPV-Typen positiv getestet. Eine Anzahl die ebenfalls sehr hoch liegt im Vergleich zu anderen Arbeiten. Combata et al. (2002) zum Beispiel, die auf die Antikörper HPV 16, 18, 31, 33, 39, 58 und 59 testeten, fanden nur 45% Mehrfachnachweise. Damit war in dieser Studie die Anzahl der Frauen mit Antikörpernachweisen gegen mehr als vier verschiedene Genotypen zwar fünf mal höher als in deren gesunden Kontrollgruppe, aber insgesamt niedriger als in dieser Arbeit. Allerdings ist einschränkend hinzuzufügen, dass sie ausschließlich Zervixkarzinompatientinnen untersuchten. Gemeinsam mit der vorliegenden Studie ist dennoch, dass die Anzahl der nachgewiesenen Antikörper gegen HPV deutlich höher war als die Anzahl der nachgewiesenen HPV-DNAs in vergleichbaren Studienpopulationen. Dies lässt wiederum vermuten, dass Frauen mit Dysplasien deutlich häufiger mit den einzelnen HPV-Typen in Kontakt kommen, als dies ein HPV-DNA-Nachweis anzeigt.

In der Literatur werden HPV-Antikörpertiter meistens als stabil über mehrere Jahre beschrieben (Carter et al., 1996; Shah et al., 1997; Geijersstamm et al., 1998). Im Gegensatz hierzu, zeigen die Daten dieser Studie, im Gesamtvergleich der Antikörperprävalenz zum ersten und letzten Besuch, mit der maximalen Prävalenz im Untersuchungszeitraum, dass Antikörper nicht nur neu gebildet, sondern auch wieder abgebaut werden können. In den Einzelverläufen lassen sich kontinuierliche An- und Abstiege der Antikörpertiter beobachten. Dies spricht, entgegen bisheriger Auffassungen, für einen dynamischen Verlauf der Antikörperlevel, mit

nur eingeschränkter Persistenz über die Jahre. Diese These des allmählichen Rückgangs der Antikörpertiter über die Zeit stützt auch eine neuere Arbeit von Carter et al. (2000).

Alternativ könnten auch lagerungsbedingt die Antikörper, zum Beispiel durch mehrmaliges ein- und abfrieren der Proben, beeinträchtigt und so Titerveränderungen nur vorgetäuscht worden sein.

4.2.Vergleich des HPV-DNA-Spektrums im Zervixabstrich mit der parallel gefundenen Seroreaktivität

Um zu sehen in wie weit spezifische IgG-Serumreaktionen gegen virus-like particles (VLPs) einen Nachweis für eine HPV-Infektion darstellen, wurden die Prävalenz von HPV-DNA (16, 18, 31, 33, 35, 45, 6 und 11) im Zervixabstrich mit dem entsprechenden Antikörperspektrum korreliert.

Wie bereits Kirnbauer et al., 1994; Nonnemacher et al. 1995 und Viscidi et al., 1997 konnte auch dieser Arbeit eine signifikante Assoziation, zumindest zwischen der einmaligen Detektion von HPV-16-DNA am Cervix uteri und dem gleichzeitigen Vorkommen von HPV-16-Antikörpern im Serum zeigen. Bei 61,7% der Patientinnen mit positivem HPV-16-DNA Nachweis waren gleichzeitig auch entsprechende Antikörper nachweisbar. Damit lag die Korrelation dieser Parameter sogar höher als in den anderen Studien von Wideroff et al., 1995 mit 48,6%, Kirnbauer et al., 1994 mit 59% und Viscidi et al. 1997, mit 46% positiven Übereinstimmungen.

Trotz des errechneten signifikanten Zusammenhangs wurden aber einerseits bei 38% der Patientinnen mit HPV-16-DNA Nachweis, dennoch keine Antikörper gegen HPV 16 nachgewiesen. Andererseits konnten bei 22% Frauen mit HPV-16-Antikörpernachweis, keine entsprechenden HPV-DNAs detektiert werden.

Beim Vergleich zwischen HPV-DNA 16, 18, 31, 33, 35, 45, 6 und 11, und dem gleichzeitigen Antikörpernachweis der entsprechenden HPV-Typen konnten keine statistisch relevanten Zusammenhänge festgestellt werden. Da die meisten Studien sich bisher auf den am häufigsten vorkommenden HPV-16-Typen beschränkt haben, ist die Datenlage über die anderen hier untersuchten HPV-Typen in der Literatur dünn und teils kontrovers. Zum Beispiel fand die Arbeitsgruppe von Bosch (Touze et al., 2001), die die Korrelation von HPV-DNA 16, 18, 31 und 58 Nachweisen mit den entsprechenden serologischen Reaktionen auf

VLPs untersuchten, ebenfalls nur sehr geringe bis gar keine Übereinstimmung der positiven Proben. Dagegen zeigten die Untersuchungen von Wideroff et al. (1999) einen deutlich stärkeren Zusammenhang zwischen den zervikalen HPV-DNAs 31 und 45 und der jeweiligen Seroreaktivität als es in dieser Studie gelungen ist. 66,7% (n=21; bei uns 0%, allerdings n=1) der HPV 31 positiven Frauen waren HPV 31 seropositiv und 70% (n=10; bei uns 37%, n=8) der HPV 45 positiven Frauen waren auch HPV 45 seropositiv. Allerdings konnten auch sie keine Übereinstimmung der Parameter bei HPV 18 feststellen. Nur 17,5% (n=17; bei uns 40%, n=10) der HPV-18-DNA positiven Frauen waren auch HPV 18 seropositiv. Dieser erhebliche Bias in Bezug auf die Korrelation zwischen den gleichzeitigen typenspezifischen HPV-DNA- und HPV-Antikörnernachweisen könnte allerdings auch mit der insgesamt geringen Fallzahl in diesen Untergruppen zusammenhängen.

Zumindest für die Frauen mit HPV-DNA- aber ohne Antikörnernachweis, läge zum Beispiel die Schlussfolgerung nahe, dass mangels Exposition der HPV-DNA gegenüber dem Immunsystem keine Antikörper gebildet werden konnten. Eine wahrscheinlichere Erklärung für die Diskrepanzen zwischen HPV-DNA- und dem gleichzeitigen HPV-Antikörnernachweis lieferte eine prospektive Studie von Carter et al. (1996). In der Arbeit von Carter et al. (1996) entwickelten die Mehrzahl der Probandinnen erst nach einer relativ langen zeitlichen Latenz, mit einem Median von 8,3 Monaten (allerdings erheblicher Streubreite) eine Seroreaktion. Die dann gebildeten Antikörper persistierten größtenteils innerhalb der Studiendauer von maximal 36 Monaten, auch nach Verschwinden von HPV-16-DNA. Demnach könnte es sich bei unseren Patientinnen mit spezifischen DNA- aber ohne entsprechenden spezifischen Antikörnernachweis auch um Neuinfizierte für diesen Typen handeln, die noch keine Antikörper gebildet haben. Im umgekehrten Fall, also bei Frauen mit Antikörpern, aber ohne DNA-Nachweis, könnten nach diesen Ergebnissen die Antikörper eine zurückliegende Infektion anzeigen.

Für diese These spricht auch, dass die Seroreaktivität in anderen Experimenten nur wenig Assoziation mit der Anzahl erst jüngst gehabtten Sexualpartner zeigte, aber stark linear mit der gesamten Anzahl an Sexualpartner zusammenhing (Carter et al., 1996; Wideroff et al., 1996; Wang et al. 1999). Im Gegensatz dazu aber scheint die Anwesenheit von zervikaler HPV-DNA eher mit der Anzahl erst jüngst gehabter Sexualpartner übereinzustimmen (Olsen et al., 1997).

Das HPV-DNA Nachweise lediglich neuere Infektionen widerspiegeln, zeigen außerdem die Arbeiten von Evander et al., 1995 und Ho et al., 1998. Sie konnten HPV-DNA nur kurzfristig

nach einer Infektion nachweisen. Dies würde auch die höhere Prävalenz von Antikörpern im Vergleich zur Prävalenz von HPV-DNAs in der vorliegenden Studie erklären.

Zwangsläufig stellt sich dennoch die Frage, warum angesichts dieser Hindernisse gerade HPV 16 im Gegensatz zu den anderen Genotypen eine so eindeutige Signifikanz in der Übereinstimmung von HPV-DNA und entsprechender Antikörper zum gleichen Zeitpunkt zeigte. Sind die HP-16-Viren virulenter als andere HPV-Typen, dass sie so häufiger zu einer Infektion und damit auch häufiger zu einer Antikörperbildung führen? Oder können HP-16-Viren ihre Beseitigung durch zelluläre Abwehrmechanismen besser umgehen, daher besser persistieren und somit häufiger gleichzeitig mit den entsprechenden Antikörpern nachgewiesen werden? Eine sehr banale, aber durchaus wahrscheinliche Erklärung wäre, dass die bessere zeitliche Übereinstimmung lediglich mit der insgesamt hohen Prävalenz von HPV 16 in dieser Population zusammenhängt.

4.3. Einfluss des Infektionsablaufes und der Dauer des DNA-Nachweises auf die Antikörperbildung

Die Ergebnisse aus dem vorigen Abschnitt zeigten nur sehr wenige Übereinstimmungen zwischen dem HPV-DNA-Nachweis an der Zervix und dem gleichzeitig gemessenen Serum-Antikörperstatus. Dies ließ vermuten, dass HPV-spezifische IgG-Reaktivität eher eine zurückliegende Exposition gegenüber HP-Viren anzeigt, während HPV-DNA-Nachweise wahrscheinlich nur Marker für aktuelle Infektionen sind. Um herauszufinden, wie genau die Art des Verlaufs und die Dauer eines DNA-Nachweises einen Einfluss auf die Antikörperreaktion hat, wurden die VLP spezifischen IgG-Reaktionen zum letzten Untersuchungstermin mit den unterschiedlichen Infektionsverläufen (DNA-Nachweismustern) im Beobachtungszeitraum verglichen.

Dazu wurde in Gruppen mit persistierender (zu jedem Untersuchungszeitpunkt nachweisbare DNA), fluktuierender (nicht kontinuierlich nachweisbare DNA oder DNA seit 6 bis 18 Monate nachweisbar), überwundener HPV-Infektion (DNA nur am Anfang des Untersuchungszeitraums oder mindestens seit >12 Monate nicht mehr nachweisbar) sowie ohne Infektion (DNA zu keinem Untersuchungszeitpunkt nachweisbar) und Neuinfektion mit HPV (DNA nur in letzter Untersuchung und nicht >6 Monate nachweisbar) eingeteilt.

55% der Patientinnen mit HPV-16-DNA-Nachweis irgendwann im Beobachtungszeitraum hatten zum Zeitpunkt der letzten Untersuchung Antikörper nachweisbar. Mit 63% positiven Antikörperreaktionen, war dieser Zusammenhang am stärksten bei Patienten mit persistierendem HPV-16-DNA-Nachweis. Im Gegensatz dazu, zeigte sich bei Frauen, die erst kürzer als sechs Monate mit dem Virus infiziert waren, keine Antikörperbildung.

Diese Daten stimmen weitestgehend mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen überein. Wideroff et al. (1995) zum Beispiel fanden bei Patienten, die an mindestens zwei aufeinanderfolgenden Untersuchungszeitpunkten mittels PCR positiv auf HPV-16-DNA getestet wurden, deutlich häufiger (83%) eine typenspezifische Antikörperbildung als bei Frauen, mit nur einmaligem HPV-DNA Nachweis (22%). Auch bei de Gruijl et al. (1997), hatten Frauen mit persistierender HPV-16-Infektion signifikant öfter positive ELISA-Werte als die mit fluktuierender Infektion. 93,7% der Studentinnen mit prevalenter HPV-16-Infektion (dauerhaftem DNA-Nachweis), verglichen zu nur 67,1% bei inzidenter Infektion (einmaligem DNA-Nachweis), serokonvertierten bei einer Studie von Carter et al., 1996.

Somit scheinen **langanhaltende, persistierende Infektionen** die Wahrscheinlichkeit für einen Kontakt von HPV-Kapsiden mit dem Immunsystem zu erhöhen und folglich eine spezifische humorale Immunantwort zu begünstigen. Alternativ könnte, bei nur einmaligem Nachweis, die PCR lediglich extrazellulär gelegene HPV-Genome detektiert haben, die zum Beispiel von einem HPV positiven Partner beim Koitus übertragen wurden und aber lediglich zu einer Exposition mit HPV, jedoch niemals zu einer echten Infektion geführt haben. Roden et al. (1997) wies darauf hin, dass HP-Virionen stabile Moleküle sind und sich mindestens eine Woche extrazellulär ihre Virulenz erhalten können. Es wäre also möglich, dass die HPV-Kapsid-Serologie eine wirklich biologisch relevante Infektion misst, während die PCR zum Teil nur extrazelluläre HPV-DNA am Zervix nachweist.

Trotzdem entwickelten nicht alle Patientinnen mit persistierendem DNA-Nachweis eine Antikörperreaktion. Daher könnte auch die **Viruslast** ein entscheidender Faktor für die Generation von Antikörpern gegen HPV-Kapside sein. Gestützt wird diese These durch Kirnbauer et al., 1994. Die Forschungsgruppe zeigte bei zytologisch unauffälligen Frauen, die sowohl für den wenig sensitiven Viratype® Assay Test (Digene Diagnostics, Beltsville, MD, USA) als auch in der hoch sensitiven PCR positiv auf HPV-16-DNA getestet wurden, eine höhere Frequenz an humoralen Immunantworten als bei denen, die lediglich in der PCR einen positiven Nachweis aufwiesen. Auch bei Wideroff et al. (1995), waren die Antikörperreaktionen höher unter Frauen, die im hybrid capture® assay positiv für HPV-16-DNA getestet wurden, als bei Patientinnen mit ausschließlich positivem PCR-Ergebnis. Exaktere Daten lieferten Viscidi et al., 1997, die unterschiedliche Viruslasten verschiedener Patientinnen direkt miteinander verglichen haben. Sie resümierten nach Abschluss ihrer Studien, dass die Antikörperbildung signifikant höher bei Patienten mit hoher als bei denen mit niedriger Viruslast ist. Folglich scheint eine große Menge eingeschleppter Viren oder eine Infektion, die mehr virales Protein produziert, effektiver eine Antikörperreaktion hervorzurufen.

Für die anderen untersuchten high risk HPV-Typen 18, 31, 33, 35, und 45 war, wegen der deutlich geringeren Prävalenz, eine Einteilung wie bei HPV 16 nur teilweise durchführbar und daher nur eine eingeschränkte Aussage möglich. Allerdings war auch bei diesen Typen, ein persistierender DNA-Nachweis zu etwa 50% mit einer typenspezifischen Antikörperbildung verbunden und damit deutlich häufiger als bei einem fluktuierenden Nachweis. Bestätigt wird dieser Trend für die Typen 18, 33 und 45 auch von Wideroff et al. (1999).

Auch bei allen Neuinfektionen mit einem DNA-Nachweis kürzer als sechs Monate wurden

durchweg keine typenspezifischen Antikörperreaktionen beobachtet. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass alle hier getesteten HPV-Antikörper mit starker Zeitverzögerung, von mehr als sechs Monaten, gebildet werden.

Bei HPV 18, 33 und 35 waren die typenspezifischen Antikörperreaktionen am Ende der Untersuchung deutlich häufiger in der Gruppe mit entsprechendem DNA-Nachweis im Beobachtungszeitraum, als bei denen ohne entsprechenden Nachweis. Bei HPV 18 war dieser Zusammenhang am deutlichsten, wenngleich nicht statistisch signifikant, zu sehen. Dieses Ergebnis unterstreicht nochmals, dass die Antikörper durchaus als Marker für eine zurückliegende Infektion angesehen werden können.

Keine solche Beziehung konnte trotz aussagekräftiger Fallzahlen bei den HPV-Typen 45, 6 und 11 beobachtet werden. Die ELISA-Werte waren sogar teils niedriger bei Frauen mit entsprechendem DNA-Nachweis im Verlauf als bei denen ohne.

Wahrscheinlich ist, dass hier die Antikörperreaktionen durch **Infektionen an anderen Körperstellen** erworben wurden. HPV 6 und 11 gelten zum Beispiel auch als Erreger der Condylomata acuminata. Interessanterweise sind in unseren Untersuchungen besonders hohe Antikörpertiter gegenüber HPV 6, bei Frauen mit makroskopisch sichtbaren Kondylomen gemessen worden, die jedoch nur teilweise HPV-6-DNA positiv an der Cervix uteri waren.

Eine weitere mögliche Erklärung wäre eine **geringere Stimulation des Immunsystems** durch diese HPV-Typen. Zum Beispiel durch eine geringere Viruslast oder geringere Virulenz, die nicht zu einer wirklichen Infektion am Zervix führt und somit seltener Antikörperreaktionen hervorruft. Aber auch **qualitative Probleme dieser Kapsid-Chargen** wären denkbar, so dass bei diesen spezifischen HPV-Typen der ELISA-Test zu ungenau gemessen hat.

Viele Patienten zeigten auch Antikörper gegen HPV-Typen, deren DNAs während des gesamten Beobachtungszeitraums nicht nachgewiesen werden konnten. Die wahrscheinlichste Erklärung wäre, dass diese Frauen bereits vor der Erstuntersuchung mit dem entsprechenden HPV-Typen in Kontakt gekommen sind. Eine andere, aber eher unwahrscheinlichere Interpretation wäre, dass der fehlende HPV-DNA-Nachweis ein falsch negatives Testergebnis darstellt. Die Abhängigkeit der repräsentativen Probenentnahme vom jeweiligen Untersucher, könnte dabei die Hauptursache darstellen. Alternativ könnten auch **Kreuzreaktionen** bestimmter Virustypen untereinander dafür ursächlich sein. Also HPV typenspezifisch gebildete Antikörper, die auch mit anderen HPV-Kapsiden eine Bindung eingehen können und so falsch positive ELISA-Ergebnis hervorbringen.

Zum Beispiel haben wir Serumreaktionen gegen HPV-11-Kapside häufiger gemessen als gegen HPV-6-Kapside (19 versus 13 positiven Frauen), obwohl HPV-11-DNA wesentlich seltener als HPV-6-DNA (5 versus 12) gefunden wurde. Ähnlichen Ergebnisse wurden bereits in anderen Arbeiten beobachtet, in denen Patienten mit Genitalwarzen untersucht wurden (Bonnez et al. 1991; Bonnez et al. 1992; Carter et al. 1995; Heim et al. 1995). Während in der Serologie etwa gleich häufig HPV 6 und 11 Antikörper gefunden wurden, war in den Kondylomen dieser Patienten wesentlich häufiger HPV-6-DNA nachweisbar. Einige Autoren schlussfolgern daher, dass HPV 6 und 11 kreuzreaktiv sind. Dies wäre auch nicht überraschend, da HPV 6 und 11 bezüglich des L1-Proteins eine 93%ige Homologie aufweisen. Es wurden für HPV 6 und 11 sowohl gleiche als auch unterschiedliche immunologische Epitope auf dem L1-Protein gefunden, die sowohl kreuzreaktive als auch typenspezifische monoklonale Antikörper hervorbrachten (Christensen et al., 1994). Auch ein direkter Vergleich der humoralen Immunantwort gegenüber 6 und 11 von Heim et al. 1995, ergab eine Bildung kreuzreaktiver und spezifischer Antikörperreaktionen, wobei die Kreuzreaktiven etwas häufiger gebildet wurden. Allerdings scheinen die kreuzreaktiven Antikörper eine höhere Affinität zu dem HPV-Typen zu zeigen, der zu ihrer Bildung geführt hat (Christensen et al., 1994). Unterschiedliche Auffassungen über den Grad der Kreuzreaktivität zwischen HPV 6 und 11 könnten daher in verschieden gewählten Grenzwerten für ein positives Ergebnis begründet sein.

Während der Grad der Kreuzreaktivität zwischen HPV 6 und 11 kontrovers diskutiert wird, lassen diese Studien vermuten, dass die Kreuzreaktivität zwischen unterschiedlicheren Typen wie zum Beispiel L1 16 und 6, die nur eine 68% Homologie zeigen, wesentlich geringer bis überhaupt nicht ausgeprägt ist. Eine von Rose et al. 1994 durchgeführte Immunisierung von Labortieren mit Hilfe von HPV-Kapsiden unterstützt diese These. Mit HPV 16, 18 und 11 inokulierte Ratten bildeten Antikörper mit wenig bis keiner Kreuzreaktivität der HPV-Typen untereinander. Auch Christensen et al. (1996), die lineare und zusammengesetzte Epitope von HPV 16 und 18 auf Kreuzreaktivität untersuchten, beurteilten die zusammengesetzten Epitope der intakten Kapside als weitgehend typenspezifisch. Allerdings wurden in dieser Arbeit keine HPV-Typen mit hoher Sequenzhomologie einbezogen. Dennoch konnte auch in der vorliegenden Studie bei Frauen mit HPV-16-DNA-Nachweis in Abhängigkeit von der Persistenz des Nachweises signifikant häufiger ($p=0,009$) eine immunologische Reaktion auf HPV-16-Kapside festgestellt werden als bei Patientinnen mit einer anderen oder keinen HPV-Infektion. Dies lässt wiederum auf eine weitgehend typenspezifische Immunantwort bezüglich HPV-16-L1 schließen. Ebenso demonstrierten Wideroff et al., 1995, ähnliche HPV-

16-Seroreaktivität bei Frauen mit HPV-Infektionen, die ausschließlich 16 L1 verwandte sowie davon stark divergierenden Proteinsequenzen aufwiesen.

Nur wenige Studien haben bisher die HPV Typen 31, 33, 35 und 45 in eine Kreuzreaktivitätsanalyse mit einbezogen. Wideroff et al. (1999) beispielsweise stellten bei der Untersuchung von HPV 16, 18, 31 und 45 fest, dass die Seroreaktivität eines HPV-Typen auch eine erhöhte Seroreaktivität anderer HPV-Typen mit sich bringt. Am stärksten beobachteten sie diese Kreuzreaktion zwischen **HPV 18 und 45** sowie zwischen **31 und 45**, während bei HPV 16 praktisch keine Kreuzreaktivität zu anderen HPV-Typen auftrat. Auch bei einer Studie von Marais et al. (2000), die Kreuzaktivitäten zwischen den HPV Antikörpern 16, 18, 31, 33 und 45 untersuchten, stellten eine schwache Korrelation zwischen HPV 18 und 45 Antikörpern fest. Somit scheinen auch die HPV-Typen 18 und 45, ähnlich wie 6 und 11, Kreuzreaktivität zu zeigen. Unwahrscheinlich ist allerdings, dass die **HPV Typen 16, 33, 35 und 45** grundsätzlich kreuzreagierende Antikörper zu einem der acht hier untersuchten VLPs produzieren, da in unserer Studie mindestens jeweils ein Patient ausschließlich für einen dieser Antikörper stark positiv getestet wurde. Dagegen kann nicht ausgeschlossen werden, dass die HPV-Typen **18 und 31** Kreuzreaktivität zu anderen HPVs zeigen, da sie nicht ausschließlich als alleinige Antikörper gefunden wurden.

4.4. Einfluss chirurgischer Interventionen am Cervix uteri auf die Anti-körperentwicklung und den DNA-Status von HP-Viren

Das routinemäßige Vorgehen zur Früherkennung des Zervixkarzinoms besteht in der Identifizierung von Frauen mit auffälligen Zervixabstrichen im Screeningverfahren. Patientinnen mit veränderter Zytologie werden einer Kolposkopie, eventuell mit anschließender Zervixbiopsie zugeführt. Gegebenenfalls erfolgt dann die chirurgische Entfernung einer histologisch gesicherten cervikalen intraepithelialen Neoplasie (CIN). Die Nachbehandlung der Patienten erfolgt durch engmaschige Kontrolle der Zervixzytologie und eventuell zusätzlich durch Kolposkopie.

Chirurgische Standardtherapien zur Eliminierung von CIN-Läsionen sind die Laserevaporisation, Kryotherapie, Portioabrasio mit Zervixkurettage und schließlich die Konisation. Einige Studien die das HPV-DNA-Spektrum prae- und post OP untersucht haben (Elfgrén et al., 2002; Kjellberg et al., 2000; Bollen et al., 1997) empfehlen zur Überprüfung eines Therapieerfolges neben den zytologischen Kontrollen auch den HPV-DNA-Nachweis durchzuführen.

Für die vorliegende Arbeit war es wichtig einen eventuellen Einfluss chirurgischer Interventionen auf die Studienpopulation zu kennen, um Diskrepanzen, zum Beispiel zwischen HPV-DNA-Verlauf und Antikörpernachweis besser beurteilen zu können. Deshalb wurden die Änderungen des HPV-DNA-Status beziehungsweise der Seroreaktivität nach einer Behandlung untersucht. Dazu wurde jeweils die erste Intervention am Zervix jeder Patientin ausgewählt und die Frauen in zwei Gruppen aufgeteilt, um eine eventuelle Zeitkomponente zu berücksichtigen. Die beiden Gruppen beinhalteten Patientinnen, die innerhalb von sechs Monaten bzw. später als sechs Monate nach dem ersten chirurgischen Eingriff nachuntersucht wurden.

In der Gruppe, die innerhalb von sechs Monaten post operativ untersucht wurde, zeigte sich eine signifikante Abnahme der high risk DNA-positiven Frauen von 100 auf 65 Prozent. Auch die low risk DNA wurde um 30%, von 59% auf 29% reduziert. Bei der Gruppe die erst später als sechs Monate post operativ untersucht wurde, zeigte sich jedoch nur eine 5%ige Abnahme der high risk positiven Patienten. Low-risk HPV-DNA wies in dieser Gruppe sogar eine signifikante Zunahme post operativ auf. Daraus kann man schlussfolgern, dass die HPV-Infektionen bei vielen dieser Patienten zunächst scheinbar beseitigt wurden, jedoch später entweder eine Reinfektion oder ein neues Aufflammen der alten Infektion stattgefunden hat.

Die Studien der letzten Jahre zeigten bei erfolgreicher, also rezidivfreier Eliminierung der CIN-Läsionen, auch eine signifikante Reduktion der HPV-DNA. Zumindest wurde die DNA des speziellen Genotyps beseitigt, der vor der Operation detektiert wurde. Zum Beispiel konnten bei einer kürzlich von Elfgren et al. (2002) veröffentlichten Arbeit mit 109 CIN Patienten nach Konisation die HPV-DNAs bei 88% und nach Kryotherapie bei 52% der Patienten 6-12 Monate postoperativ nicht mehr nachgewiesen werden. Bei Bollen et al. (1996) waren ein Jahr nach Behandlung nur noch 16 (40%) von vorher 40 HPV-DNA positiv, wovon sogar nur 11 (31%) denselben HPV-Typen postoperativ aufwiesen. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen auch Strand et al. (1997). Unter 30 HPV-DNA-positiven Patienten mit CIN-Läsionen, die entweder laserkonisiert (n = 13) oder laserevaporisiert (n=17) wurden, waren 95% 6 bis 12 Monate nach der Behandlung HPV negativ.

Bei einer anderen retrospektiven Studie stellten Chua und Hjerpe (1997) CIN-Patientinnen, mit unterschiedlich erfolgreichem Behandlungsergebnis gegenüber. Dabei zeigte sich, dass bei den 20 rezidivfreien Frauen die vorher nachgewiesenen HPV-DNAs in allen Fällen eliminiert wurden. Unter 26 Patientinnen, die später ein Rezidiv entwickelten, waren hingegen die HPV-DNAs bei 24 nach der Behandlung (3 Monate postoperativ) immer noch zu finden.

Da in der vorliegenden Studie hauptsächlich Patientinnen mit rezidivierenden Zervixdysplasien untersucht wurden, erscheint damit die nur geringe HPV-DNA-Reduktion nach einem Eingriff am Zervix leicht erklärbar.

Oft wird für die fehlende Bildung von Antikörpern gegen eine HPV-Infektion am Zervix ein mangelnder Kontakt des Virus mit dem Immunsystem der betroffenen Frauen verantwortlich gemacht (Carter et al., 1996). Deshalb könnte man vermuten, dass durch eine chirurgische Intervention bei HPV-infizierten und dem damit verbundenen Kontakt von Virus-DNA mit der Blutbahn der Patientinnen, Antikörperbildungen eventuell begünstigt werden. Auf der anderen Seite wäre auch ein Abfall bereits bestehender Antikörpertiter, infolge einer absinkenden Viruslast denkbar. Deshalb wurden neben dem HPV-DNA-Status auch die prae- und postoperativen IgG-Seroreaktionen miteinander verglichen. Dabei zeigten sich im typenspezifischen Abgleich, sowohl in der Gruppe mit Nachuntersuchung innerhalb als auch später als sechs Monate nach dem Eingriff, keine einheitlichen Veränderungen. Manche Genotypen wurden öfter, andere seltener postoperativ detektiert. Im Gruppennachweis konnten nach einem Eingriff insgesamt etwas häufiger Antikörper nachgewiesen werden, wobei es allerdings unerheblich war, ob vorher HPV-DNA an der Zervix festgestellt wurde oder nicht.

Einzig und allein die low-risk Antikörper fielen in der Gruppe mit Nachuntersuchung innerhalb von sechs Monaten leicht ab. Allerdings waren auch diese Änderungen nicht signifikant.

Andere Arbeiten, die ebenfalls die Wandlung der Seroreaktivität nach einem chirurgischen Eingriff untersucht haben, zeigten eher eine Abnahme der Antikörper. Elfgrén et al. (1996) untersuchten die Veränderungen von Serum-Antikörpertitern bei 23 Dysplasiepatientinnen 16-27 Monate nach einer Konisation. Es konnte gezeigt werden, dass Seroreaktivität gegen HPV 16 signifikant abfiel, allerdings die ebenfalls untersuchten HPV-Antikörpertypen 6 und 18 fast keine Änderung zeigten. In einer anderen Studie betrachteten Lenner et al. (1995) Antikörpertiter-Veränderungen bei Zervixkarzinom-Patientinnen nach drastischeren Therapiemaßnahmen, wie Hysterektomie und Bestrahlung. Die Probandinnen zeigten 2 bis 24 Monate nach der Therapie einen signifikanten Abfall der Antikörperlevel von HPV 16 und 18, allerdings unabhängig davon, ob sich später ein Rezidiv entwickelte oder nicht.

Der Hauptunterschied zu der vorliegenden Arbeit war, dass bei beiden Studien die Patienten im Durchschnitt wesentlich später postoperativ nachuntersucht wurden. Außerdem wurden tiefgreifendere Eingriffe durchgeführt, was die Unterschiede zu unseren Ergebnissen erklären könnte.

Zusammenfassend lässt sich für die in dieser Arbeit ausgewählten Studienpopulation mit rezidivierenden Zervixdysplasien feststellen, dass die chirurgischen Interventionen während des Beobachtungszeitraumes auf die HPV-DNA nur einen geringen und auf die Seroreaktivität praktisch keinen Einfluss gehabt haben.

4.5. Serum-Antikörpernachweise gegen HPV-VLPs im Zusammenhang mit der histologischen Entwicklung

In einer Fallkontrollstudie aus Spanien und Kolumbien mit Patienten, die z(c)ervikale intra-epitheliale Neoplasien III. Grades (CIN III) aufwiesen konnten Nonnemacher et al. (1995) in den Untersuchungsgruppen beider Länder eine ähnlich hohe Prävalenz an HPV-16-Antikörper positiven Frauen nachweisen (81% und 73%). Allerdings zeigte die Kontrollgruppe aus Kolumbien eine signifikant höhere Frequenz an HPV-16-Seroreaktivität, als die Kontrollgruppe aus Spanien. Interessanterweise stimmte dies mit der unterschiedlichen Zervixkarzinomrate beider Länder überein. In Kolumbien erkrankten achtmal mehr Frauen am Zervixkarzinom als in Spanien. Strickler et al. (1999) kamen zu einem ähnlichen Ergebnis. Sie untersuchten die Epidemiologie von HPV-16-Antikörpern in USA und Jamaika. Dabei fanden sie auf Jamaika, wo Zervixkarzinome dreimal so häufig vorkommen wie in den USA, eine doppelt so hohe Serumprävalenzrate (24% zu 12%). Diese beiden Beobachtungen unterschiedlicher Forschungsgruppen lassen eine starke Korrelation zwischen der Anwesenheit von HPV-Antikörpern im Serum und einem erhöhten Zervixkarzinomrisiko vermuten. Unterstützt wurde diese Annahme durch eine Studie von Lehtinen et al. (1996). Sie konnten zeigen, dass IgG-Reaktivität zumindest gegen HPV-16-Kapside einen prädiktiven Wert für die Entwicklung von Zervixkarzinomen besitzt. Dies wirft natürlich die Frage auf, in wie weit HPV 16 und andere Antikörpernachweise gegen HP-Viren als Biomarker in der klinischen Praxis eingesetzt werden können.

Dazu wurden in der vorliegenden Arbeit die zu Anfang beziehungsweise im Verlauf des Beobachtungszeitraums gemessene spezifische Anti-HPV-Kapsid-IgG-Serumreaktivitäten gegen die Genotypen 16, 18, 31, 33, 35, 45, 6 und 11 im Zusammenhang mit den abschließenden histologischen Ergebnissen untersucht.

Schon der einmalige Nachweis von HPV-16-Antikörpern, war in dieser Arbeit signifikant mit der späteren Entwicklung einer schweren Dysplasie verbunden. 92% der zum Erstbesuch HPV-16-Antikörper positiven Patienten, entwickelten eine CIN II oder schwerwiegendere Dysplasie. Hinweis auf den prognostischen Wert auch anderer Antikörpernachweise neben HPV 16 gab die Beobachtung, dass nur bei fehlender Seroreaktivität gegen jeden untersuchten high-risk HPV-Typen das Erkrankungsrisiko stark vermindert war. Nur durch Prüfen auch dieser Parameter konnte folglich ein ausreichender negativer prädiktiver Wert erreicht werden. Von den Patientinnen die keine IgG-Reaktivität gegen einen der sechs untersuchten

high-risk HPVs zeigten, entwickelten nur 33% eine schwere Dysplasie, im Vergleich zu 56% der Patienten, die lediglich gegen HPV 16 keine Antikörper aufwiesen. Allerdings konnte in der Einzeluntersuchung der anderen Genotypen auf einen Zusammenhang mit dem histologischen Ergebnis, lediglich für den HPV 18 Antikörpernachweis gerade noch ein statistisch relevanter Wert errechnet werden. Dennoch entwickelten auch die HPV 31, 33 und 45 Antikörper positiven Frauen häufiger eine schwere Dysplasie als die ohne jeweiligen Nachweis. Für HPV 35, 6 und 11 konnte kein Zusammenhang beobachtet werden.

Da allerdings bei 76% der seropositiven Patientinnen verschiedene HPV-Antikörper gleichzeitig nachweisbar waren, ist es schwierig eine Aussage für jeden einzelnen HPV-Typen zu treffen. Es wäre möglich, dass bei falsch negativen Patientinnen, also Frauen die für den jeweiligen Antikörper negativ getestet wurden und dennoch eine schwere Dysplasie entwickelten, eine Infektion mit einem anderen HPV Typen ursächlich war. Nur Patienten mit wirklich singulärer Infektion könnten daher genauere Daten liefern.

Trotz der durch die Mehrfachnachweise eingeschränkten Beurteilbarkeit spiegelt die unterschiedliche Signifikanz der einzelnen Typen dennoch erhebliche Divergenzen in der Dysplasieentwicklung wieder. Während der HPV-16- neben dem HPV-18-Antikörpernachweis den mit Abstand höchsten prädiktiven Wert zu besitzen scheint, hat der Nachweis der anderen HPVs nur eine eingeschränkte Aussagekraft. Daher scheinen nur wenige Frauen mit HPV 31, 33, 45 Antikörpernachweis wirklich schwere Dysplasien zu entwickeln. Die Antikörper gegen HPV 35, 6, 11 spielen in diesem Zusammenhang wohl nur eine untergeordnete Rolle.

Da einige Frauen besonders hohe Antikörpertiter aufwiesen wurde geprüft, ob diese auch ein besonders hohes Risiko für spätere Zervixerkrankungen zeigten. In der Tat entwickelten die Patientinnen mit high-risk Antikörperspiegeln, die zweifach über dem bestimmten Grenzwert lagen, also besonders starke Antikörperreaktionen zeigten, etwas öfter eine schwere Dysplasie als Patientinnen mit positiven Titern, die nur einfach über dem bestimmten Grenzwert lagen (83% versus 78%). Da aber auf der anderen Seite die Frauen mit Werten unter dem doppelten Grenzwert zu 59% ebenfalls eine schwere Dysplasie entwickelten, ist es wahrscheinlich, dass in der Gruppe mit ELISA-Werten über dem bestimmten Grenzwert einige wenige falsch positiv getestet wurden. Somit scheinen besonders hohe Antikörper-Level lediglich ein besonders eindeutig positives Ergebnis darzustellen.

Einige Studien, die bisher zumindest einen Teil der hier getesteten HPV-Typen auf einen prädiktiven Wert hin untersucht haben, stehen zumindest für HPV 16 und 6 mit diesen Ergebnissen im Einklang. So fanden Shah et al. (1997), die HPV 6 und 16 Seroreaktivität auf den Nutzen als Biomarker untersuchten, für HPV 16 ebenfalls eine starke und für HPV 6 ebenfalls keine Verbindung zu späteren Zervixkarzinomerkrankungen. Lehtinen et al. (1996) konnten sogar zeigen, dass ein HPV-16-Antikörpernachweis im Serum bereits fünf Jahre vor Diagnosestellung eines Zervixkarzinoms auf ein signifikant erhöhtes Erkrankungsrisiko hindeutet.

Über die anderen HPV-Genotypen wird jedoch kontrovers diskutiert. Zum Beispiel kamen Chua et al. (1996) nach der Durchführung einer prospektiven Studie zu dem Ergebnis, dass eine starke Korrelation zwischen HPV-16-Seroreaktivität und der Entwicklung von Zervixkarzinomen besteht. Weiterhin stellten sie fest, dass für die Seroprävalenz von HPV 18 und 33 kein erhöhtes Risiko für Zervixerkrankungen zu erwarten sei. Im Gegensatz hierzu zeigten Sigstad et al. (2002) für die Seroreaktivität gegen die drei Genotypen HPV 16, 18 und 33 eine signifikant häufigere Entwicklung von Zervixkarzinomen, wobei HPV-16-Antikörper das höchste Risiko anzeigen würden.

Bei Vonka et al. (1999) war die Prävalenz von Antikörpern gegen HPV-16-VLPs am Anfang der Untersuchung signifikant höher unter Frauen die im Verlauf der Studie mittelschwere bis schwere Dysplasien entwickelten. Im Fall von HPV 18 war dieser Unterschied zur Kontrollgruppe knapp signifikant und für HPV 33 sahen sie keinen Zusammenhang. Dillner et al. (1997) kamen wiederum zu dem Ergebnis, dass der Grad der Assoziation in der Reihenfolge HPV 16, 18, 33 abgestuft ist.

Matsumoto et al. (1997) fanden neben HPV 16 und 18 auch für HPV 58 einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Prävalenz von Antikörpern gegen diese Typen und einem erhöhten Zervixkarzinomrisiko.

In der vorliegenden Studie wurden erstmals auch Titerverläufe mit dem histologischen Ergebnis verglichen. Dabei korrelierten persistierende Antikörpernachweise, also Antikörperreaktionen die zu jedem Untersuchungszeitpunkt über dem von uns bestimmten Grenzwert lagen, stärker mit der Entwicklung einer schweren Dysplasie, als fluktuierende Antikörpernachweise, also Antikörperreaktionen die nicht kontinuierlich über dem Grenzwert lagen. Dies ist ein überraschendes Ergebnis, da allgemein angenommen wird, dass Antikörper über einen längeren Zeitpunkt konstant bleiben (Carter et al. 1996; Shah et al., 1997; Geijersstamm

et al. 1998; Grubert et al. 2004, in press). Bei der Arbeit von Geijersstamm et al. (1998) war zum Beispiel die Differenz der Antikörpertiter zwischen zwei direkt hintereinander entnommenen Patientenproben und zwischen zwei im Abstand von zwei Jahren entnommenen Blutproben einer Patientin etwa gleich groß. Sie schlussfolgern daraus, dass die Antikörperspiegel über einen langen Zeitraum lediglich einer limitierten biologischen Variabilität unterliegen. Dabei der Variabilitätskoeffizient typischer Weise zwischen 10 und 12% liegt und 15% nicht übersteigen sollte.

Folgt man dieser Einschätzung könnte es sich bei den „fluktuierenden Antikörnernachweisen“ in dieser Arbeit um kontinuierlich positive Antikörperspiegel nahe der Nachweisgrenze handeln, die nur im Rahmen der biologischen Variabilität gelegentlich unterhalb der Grenzwerte getestet wurden und dann falsch negative Bestimmungen darstellten. Alternativ könnte es sich bei den fluktuierenden Antikörnernachweisen auch um kontinuierlich negative Proben mit starker Hintergrundsaktivität oder leichter Kreuzreaktivität anderer HPV-Typen, nahe der Nachweisgrenze handeln, die innerhalb der Variabilität gelegentlich oberhalb der Grenzwerte getestet wurden. Wäre der „fluktuierende Antikörnernachweis“ eine Mischung aus beiden Thesen würde dies auch die etwas geringere Korrelation des fluktuierenden gegenüber dem persistierenden Antikörnernachweis mit der Entwicklung schwerer Präkanzerosen erklären können.

Von diesem Modell unabhängig könnte auch ein von der Viruslast abhängiger An- und Abstieg der Antikörpertiter, zum Beispiel durch zeitliche Schwankungen in der Virusproduktion, eine mögliche Erklärung für einen „fluktuierenden Antikörnernachweis“ darstellen.

Patientinnen mit anfänglich beobachteten IgG-Reaktionen, die dann aber länger als 12 Monate vor Ende des Beobachtungszeitraumes nicht mehr nachweisbar waren, hatten ein geringeres Risiko eine schwere Dysplasie zu entwickeln als Frauen mit persistierend oder fluktuierend nachweisbaren Antikörpern. Dies zeigt einerseits, dass HPV-Antikörpertiter auch wieder abfallen können (Carter et al., 2000) und andererseits sich auch Jahre bis Jahrzehnte nach einer offenbar zurückliegenden aber nicht mehr nachweisbaren Virusexposition immer noch eine Präkanzerose entwickeln kann.

Die einzige Patientin, die erst innerhalb der letzten sechs Monate des Beobachtungszeitraums serokonvertierte, zeigte keine Veränderungen an der Cervix uteri. Das könnte ein weiterer Hinweis dafür sein, dass sich Dysplasien anscheinend erst mit langer Latenzzeit nach einer Neuinfektion entwickeln (Carter et al., 1996; Wilkstrom et al., 1995).

Die zwei Frauen, die während des gesamten Beobachtungszeitraumes keine Seroreaktivität gegen einen der high-risk HPVs zeigten, entwickelten keine schwere Dysplasie. Diese Beobachtung unterstreicht den engen Zusammenhang zwischen HPV-Antikörnernachweis und dem späteren histologischen Ergebnis.

Zwischen dem Grad der cervical intraepithelial Neoplasie (CIN) und dem Anteil Patientinnen mit persistierend positiven Antikörpertitern konnte ein enger linearer Zusammenhang beobachtet werden. 83% der Patientinnen, die ein Carcinoma in situ oder Karzinom entwickelten, im Gegensatz zu 46% der Frauen ohne schwerwiegende Veränderungen, hatten persistierend Antikörper gegen mindestens einen der sechs high-risk Antikörper nachweisbar. Dies ist ein Indiz dafür, dass mehrmalige Testungen die Eindeutigkeit eines positiven Antikörnernachweises, ähnlich wie beim HPV-DNA-Nachweis (siehe 4.6.), steigern können.

4.6. HPV-DNA-Nachweise aus Zervixabstrichen im Zusammenhang mit der histologischen Entwicklung

Solange noch keine einheitliche, vergleichbare und validierte Methode der HPV-Serologie verfügbar ist, bleibt die HPV-DNA-Bestimmung die einzige Methode, eine humane Papillomavirusinfektion nachzuweisen. Seitdem bekannt ist, dass bestimmte humane Papillomaviren mit der Entwicklung von Zervixkarzinomen assoziiert sind, erhofft man sich durch diesen DNA-Nachweis bei Patienten mit auffälligen aber nicht eindeutigen pathologischen Zervixabstrichen (Pap III oder Pap III D), eine weiterführende diagnostische Information.

Folglich wurden eine Reihe an kommerziellen Test wie Vira Pap-type®, HPV Profile®, Hybrid Capture® und Hybrid Capture 2®, von Digene Diagnostics (Silver Spring, Md, USA) zur möglichst einfachen Typisierung von HPV-DNA entwickelt. Dennoch stellt die PCR immer noch die sensitivste Methode zum Nachweis von HPV-DNA dar. In der vorliegenden Studie wurde der PCR-Nachweis mit einem Line-Blot-Verfahren kombiniert, das eine gleichzeitige Genotypisierung der HPV-DNA erlaubt.

Zunächst wurde in dieser Arbeit untersucht, ob der einmalige Nachweis von high-risk HPV-DNA zum Zeitpunkt des ersten Besuchs in der I. Frauenklinik der LMU mit der späteren Entwicklung einer schweren Dysplasie in Zusammenhang stand. Dabei konnte keine signifikante Abhängigkeit dieser Variablen beobachtet werden. Dies ist nicht weiter verwunderlich, bei einer HPV-Durchseuchung von 94% in dieser Population. Nur 3 (6%) von 51 Patienten hatten keinen der 18 getesteten high-risk HPV-DNAs beim Erstbesuch nachweisbar. Dies ist ein Indiz dafür, dass der einmalige Nachweis von HPV-DNA in einer Hochrisikogruppe nur wenig hilfreich zur Kategorisierung zwischen harmlosen Veränderungen und Entwicklung schwerer Dysplasien ist (Chesebro et al., 1997).

Bei den Einzeluntersuchungen der 27 getesteten genitalen HPV-Typen zeigte nur der Nachweis von HPV 16 eine starke Tendenz zum Zusammenhang zwischen dem einmaligen HPV-DNA-Nachweis und der späteren Entwicklung schwerer Dysplasien. HPV 58 tendierte sogar zu einer Negativassoziation.

Diese Ergebnisse stimmen nur wenig mit der bisher veröffentlichten Literatur zu diesem Thema überein. Schiffman et al. (1998) zum Beispiel empfehlen, Patienten mit zytologischen Veränderungen des Grades Pap III und negativem HPV-DNA-Nachweis, im Gegensatz zu

Frauen mit Pap III und positivem HPV-DNA-Nachweis, als sicher benigne einzustufen. Wären wir dieser Empfehlung gefolgt, hätten wir zwei von den einzigen drei HPV-DNA negativen Patientinnen unserer Studienpopulation, die später eine schwere Dysplasie entwickelten, fälschlicherweise als unauffällig eingestuft und nicht weiter beobachtet. Außerdem wären alle am Erstbesuch HPV-DNA positiv getesteten Patientinnen, bei denen am Schluss histologisch nur leichte bis gar keine Dysplasien nachgewiesen wurden, unnötig verängstigt worden. Lediglich die statistisch relevanten HPV-16-DNA-Messungen hätten nach unseren Ergebnissen diesbezüglich eine 72% Testsensitivität und einen positiven prädiktiven Wert von 82% gebracht.

Verantwortlich für die Diskrepanz dieser Daten mit den bisher publizierten Forschungsergebnissen könnte das teils relativ junge Alter der untersuchten Frauen sein. Der HPV-Nachweis unter jungen sexuell aktiven Frauen wird als überwiegend temporär beschrieben (Schiffman et al., 1995, Hinchliffe et al., 1995). Schiffman et al. (1995) beobachteten eine deutlich häufigere HPV-DNA-Prävalenz bei Frauen zwischen 20-25 Jahren, als bei denen über dreißig. Auch Hinchliffe et al. (1995) stellten in ihren Experimenten fest, dass bei 93% der initial nachgewiesenen HPV-Infektionen der gleiche HPV-Typ nach vier Menstruationszyklen nicht mehr nachweisbar war. Franco et al. (1999) berechneten für onkogene HPV-DNA altersunabhängig eine mediane Nachweisbarkeitsdauer von nur 8,1 Monaten nach Neuinfektion. Angesichts der zusätzlich langen Latenzzeiten zwischen Infektion und zervikaler Veränderungen (Carter et al., 1996) und der Tatsache, dass sich unsere Patienten bereits mit auffälligen Pap-Abstrichen vorstellten, lässt den mangelnden prognostischen Wert eines einzelnen DNA-Nachweises als nicht weiter verwunderlich erscheinen.

Dieses Ergebnis spricht wahrscheinlich für eine hohe Exposition der Population gegenüber HP-Viren, die offensichtlich nur teilweise zu wirklichen Infektionen führen (siehe auch 4.3).

Ein ganz anderes Bild des Zusammenhangs zwischen HPV-DNA-Nachweis und der Entwicklung von schweren Dysplasien ergibt sich, wenn die DNA des gleichen HPV-Typs an mehreren Untersuchungszeitpunkten hintereinander positiv getestet wurde. Bei 83% der Frauen, bei denen mindestens ein persistierender high-risk HPV-DNA-Typ nachgewiesen wurde, zeigte sich eine Progression zur schweren Dysplasie. Im Gegensatz dazu entwickelten nur 44% der Frauen mit nur gelegentlich, also fluktuierend, nachweisbaren HPV-DNA-Typen am Ende eine Präkanzerose. Daraus könnte man schlussfolgern, dass „fluktuierende HPV-DNA“ wohl nur sehr selten eine wirkliche Infektion darstellt oder die Infektion bei diesen Patienten wirkungsvoll immunologisch bekämpft wird und daher auch seltener zu einer schweren Dysplasie führt.

Auch Frauen, die innerhalb des Beobachtungszeitraums vorübergehend positiv auf HPV-DNA getestet wurden, bei denen aber in den letzten 12 Monaten des jeweiligen Beobachtungszeitraums dieser Nachweis nicht mehr gelang, entwickelten deutlich häufiger eine CIN II/III-, CIS- oder CA-Läsion, als die mit fluktuierendem DNA Nachweis. Diese scheinbar überwundenen Infektionen stellen folglich ein bleibendes erhöhtes Erkrankungsrisiko dar, vorausgesetzt die HPV-DNA war vorübergehend persistierend nachweisbar.

Eine weitere Hinweis dafür, dass persistierende high-risk HPV-DNA durchaus als ein prognostischer Marker für die Entwicklung von Präkanzerosen angesehen werden kann, stellt der enge Zusammenhang zwischen persistierendem DNA-Nachweis und Grad der zervikalen intraepithelialen Dysplasie dar. Je schwerer sich die Dysplasie in der Histologie zeigte desto höher war die Anzahl der Patienten mit persistierender high-risk HPV-DNA. Besonders deutlich war dies bei HPV 16 zu beobachten. Nur 15% der Patienten mit persistierendem HPV-16-DNA-Nachweis entwickelten eine leichte bis gar keine Dysplasie. Der persistierende HPV-16-DNA-Nachweis hatte als Biomarker somit einen besseren negativen prädiktiven Wert als wenn nur irgendeiner der achtzehn verschiedenen high-risk HPVs persistierend getestet wurde (38% falsch positive). Auf der anderen Seite konnte der positive prädiktive Wert nur geringfügig gesteigert werden, wenn neben HPV 16 auch die anderen HPV-Typen in den Test mit einbezogen wurden.

Nach diesen Ergebnissen stellt folglich mehrmals hintereinander nachweisbare HPV-16-DNA unter allen HPV-DNA-Nachweisen den mit Abstand besten Marker für die Risikoeinschätzung von Frauen mit auffälligen Zervixabstrichen dar.

4.7. Testkombinationen aus HPV-DNA-Nachweisen am Zervix und Antikörpernachweisen im Serum im Zusammenhang mit der histologischen Entwicklung

Da HPV-DNA in Zervixabstrichen weit verbreitet ist und offensichtlich nur zu einem kleinen Prozentsatz eine wirkliche Infektion darstellt, ist der einmalige Nachweis nur von untergeordneter Bedeutung (vergleiche Punkt 4.6.). Der mehrmalige Nachweis des gleichen HPV-DNA-Typs ist bereits ein deutlich besserer Hinweis auf eine HPV-Infektion, aber auch nur eingeschränkt als prädiktiver Marker für eine schwere Dysplasie einsetzbar. Denn oft wird nach Monaten bis Jahren ein spontaner Rückgang der HPV-DNA beobachtet (vergleiche Punkt 4.1.), obwohl weiterhin ein erhöhtes Erkrankungsrisiko besteht (vergleiche Punkt 4.5.). Zum Beispiel zeigte eine Studie von Nonnenmacher et al. (1996) in einer Population in Grönland mit hohem Zervixkarzinomrisiko eine niedrigere HPV-DNA-Prävalenz als in einer Population in Dänemark mit niedrigem Zervixkarzinomrisiko. Bei Testung der gleichen Populationen mit Hilfe der Serologie fand man allerdings eine wesentlich höhere HPV-Exposition in Grönland als in Dänemark. Dennoch bildet die Serologie für sich allein betrachtet auch keinen sicheren Marker für eine HPV-Exposition, denn Antikörper werden erst mit Verzögerung von mehr als sechs Monaten gebildet (vergleiche Punkt 4.3.). Außerdem führen nur Infektionen mit lang anhaltendem DNA-Nachweis beziehungsweise einer ausreichenden Viruslast zu einer Antikörperbildung (vergleiche Punkt 4.3.).

Dies betont die Wichtigkeit, sowohl HPV-Antikörper als auch persistierende HPV-DNA nachzuweisen, um die Gesamtzahl der infizierten Patienten zu erfassen. Folglich ist es wahrscheinlich, dass beide Tests zusammen einen guten prädiktiven Wert für die Entwicklung schwerer Dysplasien haben.

Dazu wurde in dieser Arbeit untersucht, welche Kombinationen aus HPV-DNA- und Antikörpernachweisen unter Berücksichtigung des Verlaufs die besten Biomarker für einen prognostischen Test darstellen.

Dabei wurde festgestellt, dass wenn sowohl auf HPV-Antikörper als auch auf HPV-DNA untersucht wurde, der persistierende Nachweis von HPV-16-DNA oder der einmalige Nachweis von HPV-16-Antikörpern am stärksten mit der späteren Entwicklung einer schweren Dysplasie korrelierte ($p < 0,001$; $OR = 18,67$). Nur 7% der Patientinnen waren im Sinne dieses Tests falsch positiv und bekamen später keine schwere Dysplasie. Auf der anderen Seite entwickelten jedoch 43% der in diesem Test negativen Patientinnen dennoch eine schwere Dysplasie. Nur wenn kein high-risk Antikörper im Serum oder persistierende

high-risk DNA im Zervixabstrich nachgewiesen werden konnte, wurde mit 20% falsch Negativen der beste negative prädiktive Wert erreicht. Dies geschah allerdings zu Lasten der Sensitivität (28,8%), was den Test in unserer Population mit insgesamt sehr hoher HPV-Prävalenz, unbrauchbar erscheinen lässt. Ein Kompromiss, also ein Test mit akzeptablem positiven (84%) und negativen prädiktiven Wert (38%) könnte der Test mit Nachweis eines high-risk Antikörpers zweifach über dem Grenzwert oder eines persistierenden high-risk DNA-Typen für ein positives Ergebnis bieten. Allerdings müsste dies im Kontext der klinischen Anwendung und der damit für den Patienten verbundenen Konsequenzen beurteilt und validiert werden.

4.8. Prüfung von anamnestischen Parametern auf mögliche Risikofaktoren für eine schwere intraepitheliale Neoplasie

Nicht alle Patienten mit einer high-risk HPV-Infektion entwickeln auch eine schwere Dysplasie. Es gilt heute als sicher, dass eine Infektion mit humanen Papillomaviren eine notwendige, aber keine hinreichende Bedingung für die Entwicklung der meisten Zervixkarzinome ist. Zahlreiche Studien deuten darauf hin, dass weitere Kofaktoren an der malignen Transformation infizierter Zellen beteiligt sind (Schiffman and Brinton, 1995; Michelin et al., 1997; Ho et al., 1998; Senthil et al., 1998; Schiff et al., 2000; Kjellberg et al., 2000; Hildesheim et al., 2001; Santos et al., 2001; Thomas et al., 2001; Castle et al., 2002; Moreno et al. 2002; Munoz et al. 2002). Deshalb wurden die Parameter Rauchen, Einnahme von oralen Kontrazeptiva, Anzahl von Schwangerschaften, der Bildungsstand, eine frühe Menarche und Übergewichtigkeit auf mögliche Kofaktoren beziehungsweise unabhängige Faktoren für die Entwicklung schwerer Dysplasien in der vorliegenden Studie untersucht. Dazu wurden die Patienten abhängig vom jeweiligen Untersuchungsmerkmal dichotom aufgeteilt und die Gruppen anhand des schlechtesten histologischen Ergebnisses während des Beobachtungszeitraums miteinander verglichen. Alle anamnestischen Parameter wurden zum Zeitpunkt des Erstbesuches in der I. Universitätsfrauenklinik erhoben.

Dabei konnte sowohl HPV abhängig wie unabhängig bei keinem der untersuchten möglichen Faktoren ein signifikanter Zusammenhang mit dem vermehrten Auftreten von schweren Zervixdysplasien beobachtet werden. Dies könnte auf die teils geringen Fallzahlen der untersuchten Untergruppen zurückzuführen sein. Außerdem wirkte einschränkend für eine eindeutige Beurteilung, dass nicht alle untersuchten Kofaktoren differenziert dokumentiert waren. Zum Beispiel war bei Raucherinnen nicht bekannt wie lange die Patientinnen im Vorfeld Zigaretten konsumiert haben und ob die Nichtraucherinnen früher eventuell geraucht haben. Nach der Einnahme von oralen Kontrazeptiva wurde nur zu Beginn der Studie gefragt. Somit war nicht bekannt, ob einige Frauen während des Beobachtungszeitraums diese abgesetzt oder neu angesetzt haben und wie lange diese eingenommen wurden. Die Anzahl der Schwangerschaften war in der untersuchten Population insgesamt sehr gering und daher eine Aussage auch für diesen möglichen Risikofaktor nur wenig valide.

Zusammenfassend ist es trotz aller Einschränkungen dieser Studie unwahrscheinlich, dass das Rauchen, die Einnahme von oralen Kontrazeptiva, die Anzahl von Schwangerschaften, der Bildungsstand, eine frühe Menarche und Übergewichtigkeit einen entscheidenden Einfluss auf die Entwicklung schwerer Dysplasien haben. Dies muss allerdings in weiteren Studien bestätigt werden.

5. Zusammenfassung

Hintergrund: Humane Papillomaviren (HPV) haben eine große Bedeutung bei der Entstehung von Dysplasien und invasiven Karzinomen der Zervix. Die humorale Immunantwort auf HPV-Infektionen ist noch weitgehend unerforscht. Erst technische Entwicklungen der letzten Jahre ermöglichten einen ersten Einblick in dieses Gebiet. Ziel dieser Arbeit war es, bei Patienten mit rezidivierenden Zervixdysplasien die Prävalenz von typenspezifischen HPV-DNAs und HPV-Antikörpern sowie den Zusammenhang dieser Parameter zu untersuchen. Weiterhin sollte gezeigt werden, ob das nachgewiesene HPV-Spektrum prädiktiven Wert in Hinblick auf die Entwicklung von Neoplasien der Zervix hat.

Methode: Es wurden retrospektiv 52 Patientinnen untersucht, die wegen rezidivierenden Zervixdysplasien die I. Universitäts-Frauenklinik München in den Jahren 1987 bis 1999 aufsuchten. Von jeder Frau sollten mindestens drei Zervixabstrich verschiedener Zeitpunkte mit jeweils gleichzeitig abgenommenen Blutseren zur Verfügung stehen. Die insgesamt 178 Zervixabstriche wurden mit einer HPV-Consensus-Primer PCR auf das Vorhandensein von HPV-DNA getestet und anschließend mit einem Reverse-Line-Blot-Verfahren auf 27 Genotypen untersucht. Die 178 parallel abgenommenen Blutseren wurden mit einem Kapsid-ELISA auf acht typenspezifische HPV-Kapsid-IgG-Antikörper getestet. Dieser ELISA basiert auf leeren, Viruskapsiden, den sogenannten „virus-like particles“ (VLPs), die zuvor mit Hilfe rekombinanter Vaccinia-Virusstämme in BSC-1 Affennierenzellkulturen produziert wurden.

Während des Beobachtungszeitraumes zwischen drei und 71 Monaten wurden die Patientinnen mit verschiedenen chirurgischen Methoden (Laserevaporation, Portioabrasio mit Zervixkürrettage, Probiopsie, Konisation) behandelt und dabei Histologien gewonnen.

Ergebnisse: Bei den Patientinnen war zu Beginn des Beobachtungszeitraumes in 98% der Zervixabstriche HPV-DNA für mindestens einen der 27 untersuchten Genotypen nachweisbar. In den gleichzeitig abgenommenen Blutproben zeigten 90% der Patientinnen Seroreaktivität gegen mindestens einen der acht untersuchten HPV-Typen. Durchschnittlich wurden hierbei in den Serumproben und in den Abstrichen drei der untersuchten Antikörper- bzw. HPV-DNA-Typen gleichzeitig gefunden. Sowohl mit PCR als auch serologisch wurde HPV 16 mit 65% bzw. 50% am häufigsten nachgewiesen.

Der Vergleich der HPV-DNA in den Zervixabstrichen mit den zum gleichen Zeitpunkt detektierten Antikörperreaktionen im Serum, zeigte nur für HPV 16 einen signifikanten Zusammenhang. Wenn jedoch der Verlauf eines DNA-Nachweises in die Untersuchung mit einbezogen wurde, zeigte sich ein differenzierteres Bild. Je öfter die gleiche HPV-DNA zu verschiedenen Zeitpunkten nachgewiesen werden konnte, desto wahrscheinlicher waren am Ende des Beobachtungszeitraumes auch Antikörper gegen diesen HPV-Typen nachweisbar. Im Gegen-

satz dazu zeigten HPV-Infektionen, die kürzer als sechs Monate bestanden, nur selten Antikörperreaktionen.

Schon der einmalige Nachweis eines high-risk HPV-Antikörpers war signifikant mit der späteren Entwicklung einer schweren Dysplasie verbunden. Bei ELISA-Werten die doppelt so hoch wie die bestimmten Grenzwerte lagen war diese Beziehung noch stärker. Außerdem entwickelten sich umso häufiger schwere Dysplasien je öfter der gleiche Antikörper nachgewiesen werden konnte. Im Gegensatz dazu stand der einmalige HPV-DNA-Nachweis in keinem signifikanten Zusammenhang mit der späteren Entwicklung von CIN II/III bzw. CIS-Läsionen oder Karzinomen. Persistierende high-risk HPV-DNA-Typen waren jedoch signifikant mit der Inzidenz schwergradigen Präkanzerosen verbunden.

Wurden die Ergebnisse des Antikörper- und DNA-Tests kombiniert mit den histologischen Ergebnissen korreliert, stellte die einmalige Detektion eines HPV-16-Antikörpers oder persistierender HPV-16-DNA in Bezug auf die spätere Entwicklung einer schweren Dysplasie, den Test mit der höchsten Signifikanz dar. Allerdings konnte, wenn der Nachweis eines high-risk Antikörpers zweifach über dem Grenzwert oder einer persistierenden high-risk DNA als positives Testergebnis angesehen wurde, die beste Validität erreicht werden.

Schlussfolgerung: HPV-DNA ist in Zervixabstrichen weit verbreitet und stellt offenbar nur selten eine relevante HPV-Infektion dar. Der einmalige HPV-DNA-Nachweis erscheint daher nur von untergeordneter Bedeutung. Die mehrmalige Detektion des gleichen high-risk HPV-DNA-Genotyps ist dagegen ein deutlich besserer Hinweis auf eine onkogene HPV-Infektion. Jedoch ist auch dieser Parameter nur eingeschränkt als prädiktiver Marker für die Entwicklung schwerer Dysplasien einsetzbar. Oft wird nach Monaten bis Jahren ein spontaner Abfall der HPV-DNA beobachtet, obwohl weiterhin ein erhöhtes Erkrankungsrisiko besteht.

Die im Rahmen einer humoralen Immunantwort häufig gebildeten Antikörper erfüllen offensichtlich keine Schutzfunktion im Hinblick auf Neoplasien der Zervix. Vielmehr deutet der einmalige Nachweis eines high-risk Serumantikörpers auf eine zurückliegende oder aktuelle Infektion hin, die später signifikant häufiger in eine CIN II/III- bzw. CIS-Läsion oder Karzinom mündet. Auch mehrmalige Nachweise desselben Antikörpers zu unterschiedlichen Zeitpunkten oder besonders hohe natürlich gebildete Antikörpertiter bieten keinen Schutz, sondern zeigen eher ein hohes Risiko für eine onkogene Transformation an. Dennoch kann auch durch die Serologie alleine eine pathogene HPV-Infektion nicht sicher ausgeschlossen werden, da Antikörper erst mit Verzögerungen von mehr als sechs Monaten gebildet werden. Außerdem führen nicht alle Infektionen zu einer humoralen Immunantwort. Nur lange anhaltende DNA-Nachweise bzw. eine ausreichende Viruslast führen zu einer Antikörperbildung. Mehrmalige typenspezifische HPV-DNA- und HPV-Antikörpernachweise können sich daher ergänzen und geben zusammen wichtige weiterführende diagnostische Informationen.

6. Literaturverzeichnis

af Geijersstam V, Kibur M, Wang Z, Koskela P, Pukkala E, Schiller J, Lehtinen M, Dillner J (1998) Stability over time of antibody level to human papillomavirus type 16. *J Infect Dis* 177: 1710-1714

Bauer HM, Hildesheim A, Schiffman MH, Glass AG, Rush BB, Scott DR, Candell DM, Kurmann PJ, Manos MM (1993) Determinants of human genital papillomavirus in low-risk women in Portland, Oregon. *Sex Transm Dis* 20 (5): 274-278

Beutner KL and Tyring S (1997) Human papillomavirus and human diseases. *Am J Med* 102 (5A): 9-15

Bollen LJ, Tjong-A-Hung S, van der Velden J, Mol BW, Boer K, ten Kate FW (1997) Clearance of human papillomavirus infection by treatment for cervical dysplasia. *Sex Transm Dis* 24: 456-460

Bollen LJ, Tjong-A-Hung S, van der Velden J, Mol BW, Lammes FB, ten Kate FW (1996) Human papillomavirus DNA after treatment of cervical dysplasia. *Cancer* 77: 2538-2543

Bonnez W, Da Rin C, Rose RC, Reichman RC (1991) Use of human papillomavirus type 11 virions in an ELISA to detect specific antibodies in humans with condylomata acuminata. *J Gen Virol* 72: 1343-1347

Bonnez W, Kashima H, Leventhal B, Mounts P, Rose RC, Reichman RC, Shah KV (1992) Antibody response to human papillomavirus (HPV type 11) in children with juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis (RRP). *Virology* 188 (1): 384-387

Bosch FX, Manos MM, Munoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, Schiffman MH, Moreno V, Kurman R, Shah KV (1995) Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst* 87(11): 796-802

Brugarolas J, Chandrasekaran C, Gordon JI, Beach D, Jacks T, Hannon GJ (1995) Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency. *Nature* 377: 552-557

Burk RD, Ho GYF, Beardsley L, Lempa M, Peters M, Biermann R (1996) Sexual behaviour and partner characteristics are the predominant risk factors for genital human papillomavirus infection in young woman. *J Infect Dis* 174: 679-689

Carter JJ, Koutsky LA, Hughes JP, Lee SK, Kuypers J, Kiviat N, Galloway DA (2000) Comparison of human papillomavirus type 16, 18 and 6 capsid antibody responses following incident infection. *J Infect Dis* 181: 1911-1919

Carter JJ, Koutsky LA, Wipf GC, Christensen ND, Lee SK, Kaypers J, Kiviat N, Galloway DA (1996) The natural history of human papillomavirus type 16 capsid antibodies among a cohort of university woman. *J Infect Dis* 174: 927-936

Carter JJ, Wipf GC, Hagensee ME, McKnight B, Habl LA, Lee SK, Kuypers J, Kiviat N, Daling SR (1995) Use of human papillomavirus type 6 to detect antibodies in people with genital warts. *J Infect Dis* 172(1): 11

Castle PE, Wacholder S, Lorincz AT, Scott DR, Sherman ME, Glass AG, Rush BB, Schussler JE, Schiffman M (2002) A prospective study of high-grade cervical neoplasia risk among human papillomavirus-infected women. *J Nat Cancer Inst* 94 (18): 1406-1414

Chan PK, Li WH, Chan MY, Ma WL, Cheung JL, Cheng AF (1999) High prevalence of human papillomavirus type 58 in Chinese woman with cervical cancer an precancerous lesions. *J Med Virol* 50: 232-238

Chan PK, Mak KH, Cheung JL, Tang NS, Chan DP, Lo KK, Cheng AF (2002) Genotype spectrum of cervical human papillomavirus infection among sexually transmitted disease clinic patients in Hong Kong. *J Med Virol* 68: 273-277

Chang SY, Bernhard HU, Ong CK, Chan SP, Hofmann B, Delius H (1992) Phylogenetic analyses of 48 papillomavirus types and 28 subtypes and variants: a showcase for the molecular evolution of DNA viruses. *J Virol* 66: 714-25

Chen E, Howley P, Levison A, Seeburg P (1982) The primary structure and genetic organisation of the bovine papillomavirus type 1 genome. *Nature* 299: 529-534

Chen YH, Huang LH, Chen TM (1996) Differential effects of progestins and estrogens on long control region of human papillomavirus type 16 and 18. *Biochem Biophys Res Commun* 224: 651-659

Cheng S, Schmidt-Grimminger DC, Murant T, Broker TR, Chow LT (1995) Differentiation-dependent up-regulation the human papillomavirus E7 gene reactivates cellular DNA replication in suprabasal differentiated keratinocytes. *Genes Dev* 9 (19): 2335-2349

Chesebro MJ, Everett WD, Lorincz A (1997) High-risk human papillomavirus testing of woman with cytological low-grade squamous intraepithelial lesions. *J Lower Genital Tract Dis* 1: 234-239

Chiang C, Ustav M, Stenlund A, Ho TF, Broker TR, Chow LT (1992) Viral E1 and E2 proteins support replication of homologous and heterologous papillomavirus origins *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 5799-5803

Chow L, Nasser N, Wolinsky S, Broker T (1987) Human papillomavirus type 11 E4 gene product in human tissue implants from athymic mice. *Virology* 165: 262-267

Chow L, Hirochika H, Nasser M (1991) Human papillomavirus gene expression. *Cancer Cells* 5: 55-72

Christensen ND, Kreider JW, Shah KV, Rando RF (1992) Detection of human serum antibodies that neutralize infections with human papillomavirus type 11 virions. *J Gen Virol* 73: 1261-1267

Christensen ND, Kirnbauer R, Schiller JT, Ghim SJ, Schlegel R, Jenson AB, Kreider JW (1994) Human papillomavirus type 6 and 11 have antigenetically distinct strongly immunogenic conformationally dependent neutralizing epitopes. *Virology* 205: 329-335

Christensen ND, Dillner J, Eklund C, Carter JJ, Wipf GC, Reed CA, Cladel NM, Galloway DA (1996) Surface conformational and linear epitopes on HPV 16 and HPV 18 virus-like particles defined by monoclonal antibodies. *Virology* 233 (1): 174-184

Chua KL, Wiklund F, Lenner P, Angstrom T, Hallmans G, Bergman F, Sapp M, Schiller J, Wandell G (1996) A prospective study on the risk of cervical intra-epithelial neoplasia among healthy subjects with serum antibodies to HPV compared with HPV DNA in cervical smears. *Int J Cancer* (68): 54-59

Chua KL, Hjerpe A (1997) Human papillomavirus analysis as a prognostic marker following conization of the cervix uteri. *Gynecol Oncol* 66: 108-113

Clarke B, Chetty R (2002) Post-modern cancer: the role of human immunodeficiency virus in uterine cervical cancer. *Mol Pathol* 55: 19-24

Combata AL, Bravo MM, Touze A, Orozco O, Coursaget P (2002) Serological response to human oncogenic papillomavirus types 16, 18, 31, 33, 39, 58, 59 virus-like particles in Columbian woman with invasive cervical cancer. *Int J Cancer* 97 (6): 796-803

Crook T, Morgenstern JP, Crawford L, Banks L (1989) Continued expression of HPV 16 E7 protein is required for maintenance of the transformed phenotype of cells cotransformed by HPV 16 plus EJ-ras. *EMBO J* 8: 513-519

Crum C, Baber S, Symbula M, Snyder K, Saleh A, Roche K (1990) Coexpression of the human papillomavirus Type 16 E4 and L1 open reading frames in early cervical neoplasia. *Virology* 178: 238-246

Davey DD, Naryshkin S, Neilson NL, Kline TS (1994) Atypical squamous cells of undetermined significance: interlaboratory comparison and quality assurance monitors. *Diagn Cytopathol* 11: 390-396

de Gruijl TD, Bontkes HJ, Walboomers JM, Schiller JT, Stukart MJ, Groot BS, Chabaud MM, Remmink AJ, Verheijen RH, Helmerhorst TJ, Meijer CJ, Scheper RJ (1997) Immunglobulin G responses against human papillomavirus type 16 virus-like particles in an prospective non intervention cohort study of woman with cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 89 (9): 630-638

de Villiers EM (1997) Papillomavirus and HPV typing. *Clin Dermatol* 15: 199-206

de Villiers EM, Wagner D, Schneider A, Wesh H, Miklaw H, Wahrendorf J, Papendick U, zur Hausen H (1987) Human papillomavirus infection in woman with and without abnormal cervical cytology. *Lancet* 2: 703-706

Deacon JM, Evans CD, Yule R, Desai M, Binns W, Taylor C, Peto J (2000) Sexual behaviour and smoking as determinants of cervical HPV infection and of CIN III among those infected: a case-control study nested within the Manchester cohort. *Br J Cancer* 88: 1565-1572

- Dekmezian R, Chen X, Kuo T, Ordonez N, Katz RL** (1987) DNA hybridisation for human papillomavirus (HPV) in cervical lesions. Relationship of the presence of various viral subtypes to expression of HPV structural proteins, involucrin, and carcinoembryonic antigen. *Arch Pathol Lab Med* 111: 22-27
- Demers GW, Foster SA, Halbert CL, Galloway DA** (1994) Growth arrest by induction of p53 in DNA damaged keratinocytes is bypassed by human papillomavirus 16 E7. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 4382-4386
- Dillner J, Lehtinen M, Björge T, Luostarinen T, Youngman L, Jellum E, Koskela P, Gislefoss RE** (1997) Prospective seroepidemiological study of human papillomavirus as a risk factor for invasive cervical cancer. *J Natl Cancer Inst* 89: 1293-1299
- Doorbar J, Ely S, Sterling J, McLean C, Crawford L** (1991) Specific interaction between HPV 16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature* 352: 824-827
- Elfgren K, Bistoletti P, Dillner L, Walboomers JM, Meijer CJ, Dillner J** (1996) Conization for cervical intraepithelial neoplasia is followed by disappearance of human papillomavirus deoxyribonucleic acid and a decline in serum and cervical mucus antibodies against human papillomavirus antigens. *Am J Obstet Gynecol* 174: 937-942
- Elfgren K, Jacobs M, Walboomers JM, Chris J, Meijer LM, Dillner J** (2002) Rate of human papillomavirus clearance after treatment of cervical intraepithelial neoplasia. *Obstet Gynaecol* 100(5): 965-971
- Evander M, Edlund K, Gustafsson A, Jonsson M, Karlsson R, Rylander E, Wandell G** (1995) Human papillomavirus infection is transient in young woman: a population based cohort study. *J Infect Dis* 171: 1026-1030
- Franco EL, Villa LL, Sobrinho JP, Prado JM, Rousseau MC, Desy M, Rohan TE** (1999) Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infections in woman from a high risk area for cervical cancer. *J Infect Dis* 180: 1415-23
- Friis S, Kjaer S, Fritsch M, Møllekjær L, Olson J** (1997) Cervical intraepithelial neoplasia, anogenital cancer, and other cancer types in woman after hospitalisation for condylomata acuminata. *J Infect Dis* 175(4): 743-748
- Galloway DA, Mc Dougall J** (1989) Human papillomaviruses and carcinomas. *Adv Virus Res* 37: 126-171
- Galloway DA** (1992) Serological assays for the detection of HPV antibodies. *IARC Sci Publ (France)* 119: 147-161
- Galloway DA, Demers GW, Foster SA, Halbert CL, Russel K** (1994) Cell cycle checkpoints is bypassed by human papilloma oncogenes. Cold Spring Harbor, NY: CSHL Press, 1994: 297-306
- Galloway DA, McDougall JK** (1996) The Disruption of cell cycle checkpoints by papillomavirus oncoproteins contributes to anogenital neoplasia. *Seminars in Cancer Biology* 7: 309-315

Galloway DA (1998) Is vaccination against human papillomavirus a possibility? *Lancet* 351: 22-24

Garret LR, Perez-Reyes N, Smith PP, Mc Dougall JK (1993) Interaction of HPV 18 and nitrosomethylurea in the induction of squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis* 14: 329-332

Geng Y, Eaton EN, Picon M, Roberts JM, Kurdberg AS, Gifford A, Sardet C, Weinberg RA (1996) Regulation of cyclin E transcription by E2Fs and retinoblastoma protein. *Oncogene* 12: 1173-1180

Giardi F (1989) Die klinische Bedeutung der HPV-Infektion für das Zervixkarzinom. *Therapeutische Rundschau* 46: 847-854

Gissmann L (1992) Papillomaviruses and human oncogenesis. *Curr Opin Gene Dev* 2:97-102

Gloss B, Bernard HU, Seedorf K, Klock G (1987) The upstream regulatory region of the human papillomavirus-16 contains an E2 protein-independent enhancer which is specific for cervical carcinoma cells and regulated by glucocorticoid hormones. *EMBO J* 6: 3735-3743

Gravitt PE, Peyton CL, Apple RJ, Wheeler CM (1998) Genotyping of 27 human papillomavirus types by using L1 consensus PCR products by a single-hybridisation, reverse line blot detection method. *J Clin Microbiol* 36:3020-3027

Gravitt PE, Peyton CL, Alessi TQ, Wheeler CM, Coutlee F, Hildesheimer A, Schiffman MH, Scott DR, Apple RJ (2000) Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol* 38: 357-361

Hagensee ME, Galloway DA (1993) Growing human papillomavirus and virus like particles in the laboratory. *Papillomavirus Report* 4:121-122

Hagensee ME, Yaegashi N, Galloway DA (1993) Self-assembly of human papillomavirus type 1 capsids by expression of the L1 protein alone or by coexpression of the L1 and L2 capsid proteins. *J Virol* 67 (1):315-322

Hagensee ME, Olson NH, Baker TS, Galloway DA (1994) Three-dimensional structure of vaccinia virus-produced human papillomavirus type 1 capsids. *J Virol* 68: 4503-5

Halbert CL, Demers GW, Galloway DA (1992) The E6 and E7 genes of human papillomavirus type 6 have weak immortalizing activity in human epithelial cells. *J Virol* 66: 2125-2134

Hartwell LH (1992) Defects in a cell cycle checkpoint may be responsible for the genomic instability of cancer cells. *Cell* 71: 543-546

Harwood CA, Surentheran T, Mc Gregor JM, Spink PJ, Leigh IM, Breuer J, Proby CM (2000) Human papillomavirus infection and non-melanoma skin cancer in immune suppressed and immune competent individuals. *J Med Virol* 61: 289-97

- Heim K, Christensen ND, Hoepfel R, Wartusch B, Pinzger G, Zeimet A, Baumgartner P, Kreider JW, Dapunt O** (1995) Serum IgG, IgM, IgA reactivity to human papillomavirus types 11 and 6 virus-like particles in different gynaecologic patient groups. *J Infect Dis* 172 (2): 395-402
- Henle G, Henle W** (1976) Epstein-Barr virus specific IgA serum antibodies as an outstanding feature of nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer* 17: 1-7
- Hickman ES, Picksley SM, Vousden KH** (1994) Cells expressing HPV 16 E7 continue cell cycle progression following DNA damage induced p53 activation. *Oncogene* 9: 2177-2181
- Hildesheim A, Herrero R, Castle PE, Wacholder S, Bratti MC, Sherman ME** (2001) HPV cofactors related to the development of cervical cancer: results from a population-based study in Costa Rica. *Br J Cancer* 84: 1219-1226
- Hinchliffe SA, van Velzen D, Korporaal H, Kok PL, Boon ME** (1995) Transience of cervical HPV infection in sexually active, young woman with normal cervicovaginal cytology. *Br J Cancer* 72 (4): 943-945
- Hippeläinen M, Syrjänen S, Hippeläinen M, Koskela H, Pulkkinen J, Saarikoski S, Syrjänen K** (1993) Prevalence and risk factors of genital human papillomavirus (HPV) infections in healthy males: a study on Finish conscripts. *Sex Transm Dis* 20(6): 321-328
- Ho GY, Kadish AS, Burk RD, Basu J, Palan PR, Mikhail M, Romney SL** (1998) HPV 16 and cigarette smoking as risk factors for high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer* 78: 281-285
- Howley PM** (1990) Papillomaviridae and their replication. In: Fields BN, Knipe DM (2.ed.): *Virology*, 1625-1649 Raven Press Ltd., New York.
- Hurlin PJ, Kauer P, Smith PP, Perez-Reyes N, Blanton RA, McDougall KK** (1991) Progression of human papillomavirus Type 18-immortalized human keratinocytes to a malignant phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA* 88(2): 570-574
- IARC Working group on the evaluation of carcinogenic risks to humans** (1995) In: *IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*. Lyon, France: International Agency for research on cancer.
- Jacobs MV, Manos MM, Munoz N, Bosch FX, Kummer A, Meijer CJLM, Shah KV, Snijders PJ, Wallboomers JM** (1997) Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: extension of the worldwide IBSCC study. 16th International Papillomavirus Conference: Siena, Italy. p 455
- Jarrett WF, O'Neil BW, Gaukroger JM, Smith KT, Laird HM, Campo MS** (1990) Studies on vaccination against papillomaviruses: a comparison of purified virus, tumor retract and transformed cells in prophylactic vaccination. *Vet Rec* 126 (18): 449-452
- Kataja V, Syrjänen S, Yliskoski M, Hippeläinen M, Vayrynen M, Saarikoski S, Matztyjarvi R, Jokela K, Salonen JT, Syrjänen K** (1993) Risk factors of genital human papillomavirus infections: a case control study. *Am J Epidemiol* 138: 735-745

Kaufman RH (1996) Atypical squamous cells of undetermined significance and low-grade squamous intraepithelial lesion: diagnostic criteria and management. *Am J Obstet Gynecol* 175: 1120-1128

Kirnbauer R, Hubbert NL, Wheeler CM, Becker TM, Lowy DR, Schiller JT (1994) A virus-like particle enzyme-linked immunosorbent assay detects serum antibodies in a majority of woman infected with human papillomavirus type 16. *J Natl Cancer Inst* 86:494-9

Kjaer S, Chackerian B, van den Brule AJ, Svare EL, Panll G, Walbomers JM, Schiller JT, Bock JE, Sherman ME, Lowy PR, Meijer CL (2001) High-risk human papillomavirus is sexually transmitted: Evidence from a follow-up study of virgins starting sexual activity (intercourse) *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10: 101-106

Kjellberg L, Hallmans G, Ahren AM, Johansson R, Bergman F, Wadell G, Anstrom T, Dillner J (2000 a) Smoking, diet, pregnancy and oral contraceptive use as risk factors for cervical intra-epithelial neoplasia in relation to human papillomavirus infection. *Br J Cancer* 82(7): 1332-1338

Kjellberg L, Wandell G, Bergman F, Isaksson M, Angstrom T, Dillner J (2000 b) Regular disappearance of the human papillomavirus genom after conization of cervical epithelial dysplasia by carbon dioxide laser. *Am J Obstet Gynecol* 183: 1238-1242

Koutsky LA, Galloway DA, Holmes K (1988) Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Epidemiol Rev* 10: 122-162

Koutsky LA, Ault AA, Wheeler CM, Brown DR, Barr E, Alvarez FB, Chiacchierini LM, Jansen KU (2002) A controlled trial of human papillomavirus type 16 vaccine. *New Engl J Med* 347 (21): 1645-1651

Kuerbitz SJ, Plunkett BS, Walsh WV, Kastan MB (1992) Wild type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 7491-7495

Lacey JV, Brinton LA, Abbas FM, Barnes WA, Grawitt PE, Greenberg MD, Greene SM, Hadjimichael OC, McGowan L, Mortel R, Schwartz PE, Silverberg SG, Hildesheim A (1999) Oral contraceptives as risk factors for cervical adenocarcinomas and squamous cell carcinomas. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 8: 1079-1085

Lampert P (1991) Papillomavirus DNA replication. *J Virol* 65: 3417-3420

Lehtinen M, Dillner J, Knekt P, Luostarinen T, Aromaa A, Kirnbauer R, Koskela P, Paavonen J, Peto R, Schiller JT, Hakama M (1996) Serological diagnosed infection with human papillomavirus type 16 and risk of subsequent development of cervical carcinoma: nested case-control study. *BJM* 312: 537-539

Lenner P, Dillner J, Wiklund F, Hallmans G, Stendahl U (1995) Serum antibody responses against human papillomavirus in relation to tumor characteristics, response to treatment, and survival in carcinoma of the uterine cervix. *Cancer Immunol Immunother* 40: 201-205

- Leptak C, Ramon y Cajal S, Kulke R, Horwitz B, Riese DJ, Dotto GP, Di Maio D** (1991) Tumorigenic transformation of murine keratinocytes by the E5 genes of bovine papillomavirus Type 1 and human papillomavirus Type 16. *J Virol* 65(12): 7078-7083
- Levedakou EN, Kaufmann WK, Alkorta DA, Galloway DA, Paules RS** (1995) p21CIP1 is not required for the early G2 checkpoint response to ionizing radiation. *Cancer Res* 55: 2500-2502
- Magnusson PK, Sparen P, Gyllesten UB** (1999) Genetic link to cervical tumours. *Nature* 400: 29-30
- Majewski S, Jablonska S, Favre M, Orth G** (2001) Cytokines may favour a role for human papillomavirus in the pathogenesis of Psoriasis. *Arch Dermatol* 137(10): 1373
- Manos MM, Ting Y, Wright DK, Lewis AJ, Broker TR, Wolinsky SM** (1989) Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomavirus. *Cancer Cells* 7:209-214
- Marais D, Rose RC, Lane C, Aspinall S, Bos P, Williamson AL** (2000 a) Seroresponse to virus-like particles of human papillomavirus Types 16, 18, 31, 33, 45 in san people of Southern Africa. *J Med Virol* 60(3): 331-336
- Marais D, Rose RC, Lane C, Kay P, Nevin J, Denny L, Soeters R, Behaack CM, Williamson AL** (2000 b) Seroresponse of human papillomavirus type 16, 18, 31, 33 and 45 virus-like particles in South Africa woman with cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia. *J Med Virol* 60(4): 403-410
- Matsumoto K, Yoshikawa H, Taketani Y, Yoshiiki K, Kanda T** (1997) Antibodies to human papillomavirus 16, 18, 58 and 6b major capsid proteins among Japanese females. *Jpn J Cancer Res* 88(4):369-375
- Maymon R, Bekerman A, Werchow M, Maymon BB, Segal R, Faktor JH** (1995) Clinical and subclinical condyloma: rates among male sexual partners of woman with genital human papillomavirus infection. *J Reprod Med* 40(1): 31-36
- Michelin D, Gissman L, Street D** (1997) Regulation of human papillomavirus type 18 in vivo: effects of estrogen and progesterone in transgenic mice. *Gynecol Oncol* 66: 202-208
- Mindel A, Tideman R** (1999) HPV Transmission - still feeling the way. *Lancet* 354: 2097-2098
- Mistro AD, Bianchi C** (2001) HPV-related neoplasias in HIV-infected individuals. *Eur J Cancer* 37: 1227-1235
- Mittal R, Pater A, Pater MM** (1993) Multiple human papillomavirus type 16 glycoprotein response elements functional for transformation, transient expression, and DNA-protein interactions. *J Virol* 67: 5656-5659
- Mohr IJ, Clark R, Sun S, Androphy EJ, MacPherson P, Botchan MR** (1990) Targeting the E1 replikation protein to the papillomavirus origin of replication by complex formation with the E2 transactivator. *Science* 250: 1694-1699

Moore TO, Moore AY, Carrasco D, Straten MV, Arany I, Au W, Tying SK (2001) Human papillomavirus, smoking, and cancer. *J Cutan Med Surg*: 323-328

Moreno V, Bosch FX, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV, Walboomers JM (2002) Effect on oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case control study. *Lancet* 359: 1085-1092

Munoz N (2000) Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. *J Med Virol* 19: 1-5

Munoz N, Bosch X, Kaldor J (1988) Does human papillomavirus cause cervical cancer? The state of the epidemiological evidence. *Br J Cancer* 57: 1-5

Munoz N, Franceschesi S, Bosetti C, Moreno V, Herrero R, Smith JS, Shah KV, Meijer CJ, Bosch FX (2002) Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer : the IARC multicentric case-control study. *The Lancet* 359: 1093-1101

Nasseri M, Hirochika R, Brocker T, Chow L (1987) A human papillomavirus type 11 transcript encoding an E1, E4 protein. *Virology* 159: 433-439

Nonnenmacher B, Hubbert NL, Kirnbauer R, Shah KV, Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Viscidi R, Lowy DR, Schiller JT (1995) Serologic response to human papillomavirus type 16 (HPV 16) virus-like particles in HPV 16 DNA-positive invasive cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia grade III patients and controls from Columbia and Spain. *J Infect Dis* 172(1):19-24

Nonnenmacher B, Kruger Kjaer S, Svare EI, Scott JD, Hubbert NL, van den Brule AJ, Kirnbauer R, Walboomers JM, Lowy DR (1996) Seroreactivity to HPV 16 virus-like particles as a marker for cervical cancer in high-risk population. *Int J Cancer* 68: 704-709

Ohtani K, DeGregori J, Nevins JR (1995) Regulation of the cyclin E gene by transcription factor E2F1. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 12146-12150

Ohtsubo M, Teodoras AM, Schumache J, Roberts JM, Pagano M (1995) Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1 to S phase transition *Mol Cell Biol* 15: 2612-2624

Olsen AO, Dillner J, Gjöen K, Magnus P (1997) Seropositivity against HPV 16 capsids: a better marker of past sexual behaviour than presence of HPV DNA. *Genitour Med* 73(2): 131-135

Oriel D (1990) Genital human papilloma infection. In Holmes KK et al., *Sexually Transmitted Disease*, 2nd ed., New York, NY: Mc Graw-Hill, Inc; p 433-441

Parazzini F, Negri E, Ricci E, Franceschi S, La Vecchia C (1996) Correlates of oral contraceptive use in Italian women, 1991-1993. *Contraception* 54: 101-106

Pater M, Hughes GA, Hyslop DE, Nakshatri H, Pater A (1988) Glucocorticoid-dependent oncogenic transformation by type 16 but not type 11 human papillomavirus DNA. *Nature* 335: 832-835

Pfister H (1984). Biology and biochemistry and papillomaviruses. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 99: 111-181

Prokopczyk B, Cox JE, Hoffmann D, Waggoner SE (1997) Identification of tobacco-specific carcinogen in the cervical mucus of smokers and nonsmokers. *J Nat Cancer Inst* 89 : 868-873

Remmink Aj, Walboomers JM, Helmerhorst TJ (1995) The persistence of high-risk HPV genotypes in dysplastic cervical lesions is associated with progressive disease: natural history up to 36 months. *Int J Cancer* 61 (3): 306-311.

Roden RBS, Lowy DR, Schiller JT (1997) Papillomavirus is resistant to desiccation. *J Infect Dis* 176: 1076-1079

Roman A, Fife KH (1989) Human papillomavirus: Are we ready to type? *Clin Microbiol Rev* 2: 166-199

Rose RC, Bonnez W, Da Rin C, McCance DJ, Reichman RC (1994) Serological differentiation of human papillomavirus 11, 16 and 18 using recombinant virus-like particles. *J Gen Virol* 75: 2445-9

Ruesch MN, Lamins LA (1998) Human papilloma oncoproteins alter differentiation-dependent cell cycle exit on suspension in semisolid medium. *Virology* 250: 19-29

Santos C, Munoz N, Klug S, Almonte M, Guerrero I, Alvarez M, Valarde M, Galdos O, Castillo M, Walboomers J, Meijer C, Caceres E (2001) HPV types and cofactors causing cervical cancer in Peru. *Br J Cancer* 85 (7): 966-971

Schiff M, Miller J, Masuk M, van Asselt King L, Altobelli KK, Wheeler CM, Becker TM (2000) Contraceptive and reproductive risk factors for cervical intraepithelial neoplasia in American Indian woman. *Int J Epidemiol* 29: 983-998

Schiffman M, Solomon D, Liaw KL et al. (1998) Why, how, when the cytological diagnosis of ASCUS should be eliminated. *J Lower Genital Tract Dis* 2:165-9

Schiffman MH, Brinton LA (1995) The epidemiology of cervical carcinogenesis. *Cancer* 76:1888-1901

Sethi S, Müller M, Schneider A, Blettner M, Smith E, Turek L, Wahrendorf S, Gissmann L, Chang-Claude J (1998) Serologic response to the E4, E6 and E7 proteins of human papillomavirus type 16 in pregnant woman. *Am J Obstet Gynecol* 178(2): 366-364

Shah KV (1992) Biology of human genital tract papillomaviruses. *Urol Clin North AM* 19 (1): 63-69

Shah KV, Viscidi RP, Alberg AJ, Soyer KL, Comstock GW (1997) Antibodies to human papillomavirus type 16 and subsequent in situ or invasive cancer of the cervix. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prevention* 6 (4): 233-237

Sigstad E, Lie AK, Luostarinen T, Dillner J, Jellum E, Lehtinen M, Thoresen S, Abeler V (2002) A prospective study of relationship between prediagnostic human papillomavirus seropositivity and HPV DNA in subsequent cervical carcinomas. *British J Cancer* 87(2): 175-180

Slebos RJ, Lee MH, Plunkett BS, Kessis TD, Williams BO, Jacks T, Hedrich L, Kastan MB, Chok R (1994) P53-dependent G1arrest involves pRB-related proteins and is disrupted by the human papillomavirus 16 E7 oncoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 5320-5324

Stone KM (1995) Human papillomavirus infection and genital warts: update on epidemiology and treatment. *Clin Infect Dis* 20(suppl.1):91-97

Strand A, Wilander E, Zehbe I, Rylander E (1997) High-risk HPV persists after treatment of human papillomavirus infection but not after treatment of cervical intraepithelial neoplasia. *Acta Obstet Gynecol Scand* 76: 140-144

Stubenrauch F and Laimins LA (1999) Human papilloma life cycle: active and latent phases. *Seminars in Cancer Biology* 9: 379-386

Suzich JA, Ghim S, Palmer-Hill FJ, White WI, Tamura SK, Bell JA, Newsome JA, Jensen AB, Schlegel R (1995) Systematic immunization with papillomavirus L1 protein completely permits the development of viral mucosal papillomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 92(25): 11553-11557

Syrjänen K, Gissmann L, Koss LG (1987) Papillomaviruses and Human Disease. Berlin Springer Verlag: 518

Tachezy R, Hamsikova E, Hajek T, Mikyskova I, Smahel M, Van Ranst M, Kanka J, Havrankova A, Rob L, Guttner V, Slavik V, Anton M, Kratochvil B, Kotrsova L, Vonka V (1999) Human papillomavirus genotype spectrum in Czech women: correlation of HPV DNA presence with antibodies against HPV 16, 18, 33 virus-like particles. *J Med Virol* 58: 378-386

Thomas DB, Ray RM, Qin Q & the WHO collaborative study of neoplasia and steroid contraceptives (2002) Risk factors for progression on squamous cell cervical carcinoma in-situ to invasive cervical cancer: results of a multinational study. *Cancer Causes Control* 13: 683-690

Touze A, de Sanjose S, Coursaget P, Almirall MR, Palacio V, Meijer CJ, Kornegay J Bosch FX (2001) Prevalence of anti-human papillomavirus type 16, 18, 31, and 58 virus-like particles in woman in the general population and in prostitutes. *J Clin Microbiol* 39(12): 4344-4348

Towbin H, Staehlin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamid gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 4350-4354

Ustav M, Stenlund A (1991) Transient replication of BPV1 requires two viral polypeptides encoded by the E1 and E2 open reading frames. *Eur Mol Biol Org J* 10:449

- van den Brule AJ, Walboomers JM, Du Maine M, Kenemans P, Meijer CJ** (1991) Difference in prevalence of human papillomavirus genotypes in cytomorphologically normal cervical smears is associated with a history of cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer* 48: 404-408
- van Ranst M, Fuse A, Fiten P, Beuken E, Pfister H, Burk RD** (1992) Phylogenetic classification of human papillomaviruses: correlation with clinical manifestations. *J Gen Virol* 73: 2653-60
- Viscidi RP, Kotloff KL, Clayman B, Russ K, Shapiro S, Shah KV** (1997) Prevalence of antibodies to human papillomavirus (HP type 16 virus-like particles) in relation to cervical HPV infection among college woman. *Clin Diagn Lab Immunol* 4(2): 122-126
- von Knebel Doeberitz M, Rittmüller C, zur Hausen H, Durst M** (1992) Inhibition of tumorigenicity of cervical cancer cells in nude mice by HPV E6-E7 anti-sense RNA. *Int J Cancer*. 51: 831-4
- Vonka V, Hamsikova E, Kanka J, Ludvikova V, Sapp M, Smakel M** (1999) Prospective study on cervical neoplasia IV. Presence of HPV Antibodies. *Int J Cancer* 80(3): 365-368
- Walboomers JM, Jacobs MV, Munoz MM** (1999) Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 189: 12-19
- Wang Z, Konya J, Avall-Lundkvist E, Sapp M, Dillner J, Dillner L** (1997) Human papillomavirus antibody response among patients with incident cervical carcinoma. *J Med Virol* 52 (4): 436-440
- Wang ZH, Kjellberg L, Abdalla H, Wiklund F, Eklund C, Knekt P, Lehtinen M, Kallings I, Lenner P, Hallmans G, Mahlck CG, Wadell G, Schiller J, Dillner J** (1999) Typespecificity and significance of different isotypes of serum antibodies to human papillomavirus capsids. *J Infect Dis*:
- Wideroff L, Schiffman MH, Nonnemacher B, Hubbertus N, Kirnbauer R, Greer CH, Lowy D, Lorincz AT, Manos MM, Glass AG** (1995) Evaluation of seroreactivity to human papillomavirus type 16 virus-like particles in an incident case-control study of cervical neoplasia. *J Infect Dis* 172:1425-30
- Wideroff L, Schiffman M, Haderer P, Armstrong A, Greer CE, Manos MM, Burk RD, Scott DR, Sherman ME, Schiller ST, Hoover RN** (1999) Seroreactivity to human papillomavirus types 16, 18, 31, and 45 virus-like particles in a case-control study of cervical squamous intraepithelial lesions. *J Infect Dis* 180(5): 1424-1428
- Wikstrom A, van Doornum GJ, Quint WG, Schiller JT, Dillner J** (1995) Identification of human papillomavirus seroconversions. *J Gen Virol* 76(3): 529-539
- Yoshikawa H, Nagata C, Noda K** (1999) Human papillomavirus infection and other risk factors for cervical intraepithelial neoplasia in Japan. *Br J Cancer* (80): 621-624
- zur Hausen H** (1991 a) Human papillomaviruses in the pathogenesis of anogenital cancer. *Virology* 184: 9-13

zur Hausen H (1991 b) Viruses in human cancer. Science 254: 1167-1173

zur Hausen H (1994) Molecular pathogeneses of cancer of the cervix and its causation by specific human papillomavirus types. Curr Top Microbiol Immunol 186: 131-156

zur Hausen H, Richart RM (1995) IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. Human papillomavirus Lyon, France 64: 277-289

7. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------|---|
| A | Adenosin |
| AK | Antikörper |
| AP | alkaline Phosphatase |
| β | Beta |
| beob. | beobachteter Wert |
| bzw. | beziehungsweise |
| C | Cytidin |
| °C | Grad Celsius |
| CA | Karzinom |
| ca. | circa |
| CIN | cervicale intraepitheliale Neoplasie |
| CIS | Karzinom in situ |
| dATP | Desoxy-Adenosin-5'-Triphosphat |
| dCTP | Desoxy-Cytidin-5'-Triphosphat |
| dGTP | Desoxy-Guanin-5'-Triphosphat |
| DMEM | Dulbecco's modification of Eagle's medium |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | monomere Desoxynukleotidtriphosphate |
| dTTP | Desoxy-Thymidin-5'-Triphosphat |
| dUTP | Desoxy-Uridin-5'-Triphosphat |
| E | early |
| EBV | Ebstein-Barr-Virus |
| ECL | enhanced-chemiluminescence |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| ELISA | Enzym-Linked Immunosorbent Assay |
| erw. | erwarteter Wert |
| FBS | fetal bovine serum |
| g | Gramm |
| G | Guanidin |
| G1-Phase | Phase der Intermitose im Zellzyklus |
| G2-Phase | Phase der Intermitose im Zellzyklus |
| HIV | human immunodeficiency virus |
| HPV | humaner Papillomavirus |
| IgG | Immunglobulin G |
| L | late |
| LMU | Ludwig-Maximilians-Universität |
| l | Liter |
| M | Adenosin + Cytidin |
| m | milli |
| M | Molar |
| μl | Mikroliter |
| μM | Mikromolar |
| m/s ² | Meter pro Sekunde ² |
| MgCl ₂ | Magnesiumchlorid |
| min | Minute |
| ml | Milliliter |
| mM | Millimolar |

| | |
|----------------------------------|--|
| M-Phase | Mitosephase im Zellklus |
| n | Fallzahl in einer statistischen Gruppe |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NaH ₂ PO ₄ | Natriumdihydrogenphosphat |
| NaOH | Natriumhydroxid |
| NCR | noncoding region |
| neg. | negativ |
| nm | Nanometer |
| NP-40 | Nonident P-40 |
| OP | Operation |
| ORF | open reading frame |
| <i>p</i> | Irtumswarscheinlichkeit |
| PA/CC | Portioabrasio mit Zervixkürettage |
| Pap | Papanicolaou (Färbemethode für Zervixabstriche) |
| PBSD | 1 M Phosphate Buffered Saline; 0,5 mM MgCl ₂ ; 0,9 mM CaCl ₂ |
| PBST | Phosphate Buffered Saline mit 0,05% Tween 20 |
| PC | Personal Computer |
| PCR | Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction) |
| pers. | persistierend |
| pH | pondus Hydrogenii |
| pos. | positiv |
| R | Adenosin + Guanidin |
| ® | registered (trademark) |
| rpm | rambles per minutes |
| SDS | Sodium-Dodecylsulfat |
| S-Phase | Synthesephase im Zellzyklus |
| SSPE | Sodiumphosphatlösung mit NaCL, EDTA, 1% ProClin |
| T | Thymidin |
| TE | Tris-EDTA-Puffer |
| UFK | Universitätsfrauenklinik |
| U/min | Umdrehungen pro Minute |
| unab. | unabhängig |
| URR | upstream regulatory region |
| UV | Ultraviolett |
| VLP | virus-like particles |
| W | Adenosin + Thymidin |
| Y | Cytidin + Thymidin |

Danksagung

Ich möchte die Gelegenheit dazu nutzen mich bei folgenden Personen ganz herzlich zu bedanken:

Herrn Dr. med. Dipl. Chem. Thomas A. Grubert, von I. Universitätsfrauenklinik der LMU, für die Vergabe und Betreuung der Dissertation, sowie der Bereitstellung aller Räumlichkeiten und Materialien für den experimentellen Teil der Arbeit

Herrn Prof. Dr. med. G. Stauber, von I. Universitätsfrauenklinik der LMU, für seine Bereitschaft die Arbeit vor der Medizinischen Fakultät zu vertreten

Frau Professor Denise Galloway, vom Fred Hutchinson Cancer Research Center in Seattle, USA, für die Ermöglichung eines Forschungsaufenthaltes in ihrem Institut.
Ihren Mitarbeitern Herrn Dr. Joseph Carter und Dr. Michael Hagensee für die ständige Diskussionsbereitschaft und die Bereitstellung der Vaccinia-Viren zur Herstellung der Virus-kapside (VLPs) sowie Frau Kristine Robinson und Herrn Gregory Wipf für die Einarbeitung in die VLP-Herstellung in BSC-1-Zellkulturen und der ständigen Präsenz als Ansprechpartner für alle technischen Fragen während meines USA-Aufenthaltes

Herrn Dr. Wiseman vom Leibniz-Rechenzentrum für seine geduldige Beratung in allen statistischen Fragestellungen

Herrn Dr. med. Tilmann Oppel für die kritische Durchsicht der vorliegenden Arbeit und seine entgegengebrachte Unterstützung und Hilfsbereitschaft

Herrn Dr. med. Dr. Phil. Martin Ebinger für die Unterstützung bei allen Höhen und Tiefen während des Verfassens der Dissertation und den interessanten intellektuellen Austausch

Der Firma Roche-Molekular Systems, Alameda, CA, USA für die Überlassung von Consensus Primer PCR/Reverse-Line-Blot-Gentypisierungskits zur Bestimmung von typenspezifischer HPV-DNA

Herrn Dr. Neil Christensen, vom Penn State Medical Center, USA, für die Bereitstellung von in Lebendmäusen hergestellten Antikörpern gegen typenspezifische HPV-Kapside

Curriculum vitae

Name: Marc Philipp Christian Mosner
Geburtsdatum: 07.01.1972
Geburtsort: München
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Eltern: Dipl. Kfm. Hansjörg Mosner
Karin Mosner (geb. Bimpage)
Geschwister: Dr. med. Alexander Mosner (geboren 16.09.1969)
Facharzt der Urologie an der Universität in Bern

Schulausbildung

1978-1982 Haimhauser Grundschule in München
1982-1985 Albert Einstein Gymnasium in München (humanistisch-
neusprachliche Ausrichtung)
1985 Umzug nach Stuttgart
1985-1991 Karls-Gymnasium in Stuttgart (humanistische Ausrichtung)
18.Juni 1991 Schulabschluss mit der allgemeinen Hochschulreife

Wehrdienstzeit

1991-1992 Sanitätsakademie in München, im II. Batallion der Allied
Command Mobil Forces (AMF). Einheit für internationale
humanitäre Hilfseinsätze

Akademische Ausbildung

1992-1994 Studium der Architektur an der Hochschule für Architektur und
Bauwesen in Weimar.
1994-2001 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Uni-
versität in München
21.Aug.1996 Ärztliche Vorprüfung (Physikum)
28.Juli 1997 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
21.März 2000 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
30.Okt. 2001 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Gesamtnote der Ärztlichen Prüfungen: „gut“

Famulaturen

| | |
|------------------|---|
| März /April 1997 | Department of Obstetrics and Gynecology, Prof. A.E. Schaetzing M.D., Tygerberg Hospital, Stellenbosch University, Cape Town (South-Africa) |
| März/April 1998 | Department of Orthopaedics, Benjamin E. Bierbaum, M.D. (Chairman), New England Baptist Hospital, Tufts University and Harvard Medical School, Boston (USA) |
| Okt. 1998 | Primary care and internal medicine, Thomas S. King, M.D. and Henry B. Polin, M.D, The Polyclinic, Seattle (USA) |
| Okt. 1999 | Dermatologische Abteilung, Prof. Dr. med. G. Plewig, Innenstadtlinik der Ludwig-Maximilians-Universität, München |

Praktisches Jahr

| | |
|---------------------|---|
| Aug.-Nov. 2000 | Innere Medizin an der Medizinische Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München, unter der Leitung von Prof. Dr. med. D. Schlöndorff |
| Dez. 2000-März 2001 | Gynäkologie an der I. Frauenklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München, unter der Leitung von Prof. Dr. med. G. Kindermann |
| April-Juli 2001 | Chirurgie an der Innenstadtlinik der Ludwig-Maximilians-Universität München unter der Leitung von Prof. Dr. med. Mutschler |

Extrakurrikuläre Kurse

| | |
|------------|---|
| SS/WS 1997 | Tropenmedizinischer Kurs I und II, einschließlich Übungen im diagnostischen Mikroskopieren unter der Leitung von Prof. Dr. med. Löscher |
| 1996/97 | Kurs für Sportmedizin I und II einschließlich der sportmedizinischen Praktika bei Prof. Dr. med. Hillemanns |

Studiumbegleitende Tätigkeiten

| | |
|-----------------------|--|
| 1995 - 1999 | Regelmäßig eigenverantwortliche Nachtwachen im Krankenhaus Rechts der Isar, München und Marienhospital Stuttgart |
| Juli 2002 - Feb. 2003 | Freier Mitarbeiter bei Harrison Clinical Research, Gesellschaft für klinische Forschung, in München |

Arzt im Praktikum und Assistenzarzt

| | |
|----------------|--|
| seit März 2003 | Gynäkologie und Geburtshilfe am Klinikum Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität München, unter der Leitung von Prof. Dr. med. H. Hepp |
|----------------|--|

Promotion

Klinisch-Experimentelle Arbeiten über die spezifische humorale Immunantwort von humanen Papillomaviren bei Patienten mit rezidivierenden Zervixdysplasien unter der Leitung von Dr. med. Dipl. chem. T. Grubert der I. Universitäts-Frauenklinik in München und in enger Zusammenarbeit mit Prof. Denise A. Galloway vom Fred Hutchinson Cancer Research Center in Seattle, USA. Angewendet Methoden: PCR, ELISA und Westernblott sowie Aufzucht von Viruskapsiden in Zellkulturen.

Sept. und Okt. 1998 Forschungsaufenthalt am Fred Hutchinson Cancer Research Center der University of Washington, in Seattle, USA, unter der Leitung von Prof. Denise A. Galloway.

Veröffentlichungen Grubert TA, **Mosner M**, Bauer S, Robinson K, Galloway DA (1999) University of Munich, I. Frauenklinik, Germany and Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA (USA). Serum-antibodies against various HPV-types in woman with recurrent cervical dysplasia and persistent DNA-HPV findings. 17th International Papillomavirus Conference, Charleston, SC (USA) (*Poster presentation*)

Mosner M, Bauer S, Galloway DA, Grubert TA (2000) HPV-DNA und Anti-HPV-Serumantikörper bei Frauen mit rezidivierenden Zervixdysplasien. I. Frauenklinik der Universität, München und Fred Hutchinson Cancer Research Center Seattle /USA. Geburtshilfe und Frauenheilkunde - German Journal of Obstetrics and Gynecology 60 Supplement zum 53. Kongress der DGGG-Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe: 149

Fremdsprachen Englisch fließend in Wort und Schrift
Französisch Grundkenntnisse
Großes Latinum

EDV-Kenntnisse Microsoft Word, Excel, PowerPoint, SPSS

Freizeitaktivitäten Segeln im Akademischen Seglerverein mit jahrelanger ehrenamtlicher Tätigkeit in verschiedenen Chargen.
Mountainbikern, Fotografie, Skifahren